

UNIVERSITE PARIS EST CRETEIL-VAL DE MARNE
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIE

THÈSE

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Paris Est
Spécialité : Sciences de l'Univers et de l'Environnement

Présentée par :

Astrid-kim RAIMBAULT

**Le brunissement interne de l'ananas (*Ananas comosus* (L.) M) induit par
un traitement au froid en post-récolte : physiopathie, mise au point d'outils
moléculaires, expression de gènes et activités enzymatiques impliquées
dans le catabolisme protéique**



Soutenance : 9 décembre 2011

Direction de thèse et encadrement: Y. Zuily-Fodil, Professeure émérite à l'Université Paris Est-Créteil - Co-encadrement: Dr M.H Cruz de Carvalho, Maître de Conférences de l'Université Paris Est-Créteil et Dr A. Soler, Chargé de Recherche du CIRAD-PRAM Martinique

Jury

F. Corbineau, Professeure Université Paris 6 Pierre et Marie Curie
H. Sallanon, Professeure Université d'Avignon et Pays de Vaucluse
P. Mora, Professeur Université Paris Est-Créteil
A. Limami, Professeur Université d'Angers
Y. Zuily-Fodil, Professeure émérite, Université Paris Est-Créteil
MH. Cruz de Carvalho, Maître de Conférences Université Paris Est-Créteil
A. Soler, Chargé de Recherche, CIRAD-PRAM Martinique

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examinatrice
Examinatrice
Examineur

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé successivement au CIRAD-PRAM de la Martinique (Centre International de Recherche Agronomique pour le Développement, Pôle de recherche Agro-Environnemental de la Martinique) et au laboratoire IBIOS-BIOEMCO (UMR 7618, Université Paris-Est Créteil-Val de Marne).

A l'issue de ce long travail de thèse, je tiens à exprimer chaleureusement ma gratitude au Professeur Yasmine Zuily-Fodil, ma directrice de thèse, pour son encadrement, sa confiance, son soutien et la formation scientifique qu'elle m'a donnée.

Je remercie le Docteur Maria Helena Cruz de Carvalho, et le Docteur Alain Soler, pour leur encadrement scientifique et l'aide qu'ils m'ont apporté au long de cette thèse.

Ma reconnaissance va aux professeures Françoise Corbineau et Huguette Sallanon, qui en dépit de leurs lourdes responsabilités, ont néanmoins accepté de rapporter sur mon travail.

Je remercie chaleureusement les Professeurs Anis Limami et Philippe Mora d'avoir accepté de faire partie du jury.

Je souhaite remercier vivement toute l'équipe du LEPM-IBIOS qui m'a permis de travailler dans les meilleures conditions qui soit : Les Professeurs Anne Repellin et Daniel laffray aux commandes du laboratoire, pour leur écoute, leur soutien constant et leur contribution au bon déroulement de cette thèse.

Aux membres du laboratoire mes sentiments chaleureux : à mes collègues thésards, Biet, Judicaëlle, Marien, Rafiq, Ruben et Ulrick, avec lesquels j'ai partagé échanges scientifiques et nombreux bons moments. A Luis, Manuel, Mathieu pour leurs conseils bienvenus et Chantal qui m'a formée en qPCR. A Agnès, Fryni, Gilberte, Juliette et Pascale qui ont su créer une ambiance conviviale tellement précieuse au quotidien.

Mes remerciements sincères vont également aux collègues avec lesquels j'ai travaillé : Léonide, Michel Stéphanie et Virginie d'IBIOS ; Sonia et Sandrine du laboratoire CRRET, pour leur accueil sans réserve et pour leur aide précieuse lors des expériences de biochimie.

J'exprime ma reconnaissance à Messieurs François Cote et Jean Pierre Horry du Cirad Montpellier qui ont participé au montage de cette thèse Cirad-UPEC.

A mes collègues de la Martinique ma gratitude : Mr Christian Chabrier, Directeur du PRAM pour sa confiance, son soutien et nos échanges ; L'équipe « ananas » pour son aide précieuse dans les champs et au laboratoire : Cathy, Marie-Pierre, Bernard, et Paul. Sans oublier les autres chercheurs et thésards du PRAM, Penina, Phillipe, Raphael, Christian, Fabrice pour leur aide logistique qui fut la source de moments conviviaux.

Au personnel administratif et technique du PRAM que j'ai si souvent sollicité et qui m'ont si gentiment aidée, tous mes remerciements : Francois Roch, Myriam Valette, Odile René-Corail, Jacqueline Rein, Jacqueline Legendry.

Un merci tout particulier aux VCATs et aux stagiaires qui se sont succédé durant mon séjour pour la petite famille que nous avons créé : Anh, Céline, Floriane, Ludivine, Sabrina, Stéphane, sans vous, la Martinique n'aurait pas été la même !

Ma reconnaissance à Maiwen et à ses parents pour m'avoir si gentiment accueillie et logée pendant mes périodes de transitions.

Mon affectueuse gratitude à ma famille qui m'a bien entourée et en particulier à ma mère et à ma grand-mère. A mes amis, et spécialement à Nelly, mes remerciements pour m'avoir encouragée et soutenue pendant ces longues années d'études.

Un Merci particulier à Steeve qui sait me supporter et m'encourager lorsque cela devient nécessaire....

Abréviations

ABA	Acide abscissique
AP	Protéase à acide aspartique
APX	Ascorbate peroxidase
BI	Brunissement interne
CAT	Catalase
CBF	C repeat binding factor
COR	Cold regulated
CP	Cysteine protease
DRE	Dehydration responsive element
EAO	Espèces réactives de l'oxygène
F	Froid
FAD	Fatty acid desaturase
FB	Fruit bromelain
FT	Facteur de transcription
GA3	Acide gibbéréllique
GARCs	Gibberellic acid responsive element
GR	Glutathione reductase
GST	Glutathione S transferase
Hsp	Heat shock protein
IP3	Inositol 1,4,5 triphosphate
JA	Acide Jasmonique
LEA	Late embryogenesis abundant
LOX	Lipoxygenase
LTI	Low temperature induced
MCP	Mort cellulaire programmée
1- MCP	1-methylcyclopropen
MP	Métalloprotéase
PAL	phénylalanine ammonia-lyase
PCT	Postharvest chilling stress
PLD	Phospholipase D
POD	Peroxidase
PPO	Polyphenol oxydase
SA	Acide Salicylic
SC	Smooth Cayenne
SOD	Superoxide dismutase
SP	Protéase à sérine
TIF	Traitement induction Florale
TP	Thréonine à protéase
TPR	Traitement post-récolte
ZT	zeatine

Liste des illustrations

Liste des figures

Synthèse bibliographique

Figure 1 : Aspect général d'un plant d' <i>Ananas comosus</i>	14
Figure 2 : Représentation schématique d'une portion de feuille d'ananas	14
Figure 3: Fonctionnement d'un trichome de feuille d'ananas.....	15
Figure 4 : Cylindre central d'un plant d'ananas	15
Figure 5 : Fleurs d'ananas Cayenne	16
Figure 6 : Fleur et fruit individuelle d'ananas.....	16
Figure 7 : Unités morphologiques des yeux d'ananas.....	16
Figure 8 : Morphologie de la coupe longitudinale	16
Figure 9 : Plantation de rejets de cultures sur paillage en polyéthylène	19
Figure 10 : Symptômes de brunissement interne de l'ananas au stade final.....	27
Figure 11 : Les différents polyphénols.....	28
Figure 12 : Voie de synthèse simplifiée des phénylpropanoïdes faisant intervenir la phénylalanine ammonia-lyase	29
Figure 13 : Localisation des composés phénoliques et des enzymes d'oxydation PPO	30
et POD dans une cellule végétale.....	30
Figure 14 : Réaction d'oxydation des mono et diphenols par l'activité enzymatique	30
de la PPO et processus non enzymatique de la formation de polymères bruns	30
Figure 15 : Les étapes de brunissement des composés phénoliques	31
Figure 16 : Réponse des plantes aux contraintes biotiques et abiotiques via.....	33
la régulation des EAO par un système de régulation non enzymatique.....	33
Figure 17 : Les 2 types de stress au froid dans une cellule de plantes	38
Figure 18 : Stratégie adaptative des plantes aux stress abiotiques	40
Figure 19: Phase de transition d'une couche de phospholipides membranaires ..	44
Figure 20 : Bicouches lipidiques présentant les effets d'une insaturation des lipides	44
Figure 21 : Mécanisme général de l'hydrolyse des protéines par les protéases....	47
Figure 22 : Structure tridimensionnelle de la papaïne et son site actif	49
Figure 23 : Réaction catalytique réalisée par le site actif d'une protéase à cystéine	49
Figure 24 : Protéase à acide aspartique (rénine) en trois dimensions	51
et son site catalytique	51
Figure 25 : Réaction catalytique au site actif AP	52
Figure 26 : Structure d'une oryzacystatine	55
Matériel et méthodes	
Figure 1 : Champ d'ananas de la station Morne Rouge (Martinique).....	57
Figure 2 : Traitements des variétés d'ananas	58
Figure 3 : Amplification d'une séquence partielle d'ADNc d'une protéase à acide aspartique par RACE 5'et 3'	70
Chapitre 1	
Figure 1 : efflux d'électrolytes relatifs	80
Chapitre 2, article 1	
Figure 1: Internal browning scale on variety Flhoran 41	92
Figure 2: PPO and POD specific activity differences between chilled fruits and controls for the four varieties	97
Figure 3: PPO and POD isoform differentiation on micro native PAGE: Flhoran 53 protein extract	98

Figure 4: Electrophoretic separation of PPO in different pineapple varieties with or without IB symptoms	99
Figure 5: Electrophoretic separation of POD in different pineapple varieties with or without IB symptoms	100
Chapitre 3, article 2.....	
Figure 1: Kinetic fruit Relative Injury index in two pineapples varieties differing in their susceptibility to Blackheart	119
Figure 2: Average expression stability values (M) of references genes during the stepwise exclusion of the least stable control genes	121
Figure 3: Determination of the optimal number of reference genes for normalization by pairwise variation (V_n/V_{n+1}) analysis between normalization factor NF_n and NF_{n+1} for accurate normalization of qPCR data.....	121
Figure 4: Relative quantification of fruit bromelain gene under postharvest chilling treatment for MD2 (resistant) and SC (Smooth Cayenne; susceptible) varieties using qPCR	122
Figure 5: Effect of postharvest chilling treatment on cysteine protease activity in two varieties of pineapple: MD2 (resistant) and Smooth Cayenne (SC) (susceptible), submitted to control condition (C), and to postharvest chilling treatment (PCT)	123
Figure 6: Relative quantification of cystatin gene expression under postharvest chilling treatment for MD2 (resistant) and Smooth Cayenne; susceptible) varieties using qPCR	124
Chapitre 3, article 3.....	
Figure 1: Nucleotide sequences of ACAP1 cDNA (GenBank accession no JN858110) and its deduced amino acid sequence.	141
Figure 2: Schematic representation of putative AcAP1	142
Figure 3: Sequence alignment of the putative AcAP1 with other plant aspartic proteases. ..	143
Figure 4: Phylogenetical analysis of plant aspartic acid proteases	145
Figure 5: Real-time qPCR expression analysis of AcAP1 under postharvest chilling treatment in two pineapple varieties differing in their susceptibility to postharvest chilling stress, MD2 (resistant) and Smooth Cayenne (SC) susceptible	146
Figure 6: Aspartic acid protease activities under postharvest chilling treatment in two varieties of pineapple differing in their susceptibility to blackheart	147
Chapitre 4.....	
Figure 1 : Activités enzymatiques spécifiques de la PAL.....	162
Figure 2 : Activités enzymatiques spécifiques de l'APX.....	163
Figure 3 : Réponse du gène codant une APX au traitement post-récolte (TPR) chez 2 variétés d'ananas MD2 et SC	164
Discussion générale	
Figure 1 : Modèle proposé pour la réponse des ananas à la contrainte au froid en post-récolte	176

Liste des Tableaux

Synthèse bibliographique	
Tableau 1 : Illustration des différents groupes d'ananas	23
Matériel et Méthodes	
Tableau 1 Amorces utilisées pour le RACE.....	70
Chapitre 1	
Tableau 1 : Les 4 variétés d'ananas MD2, SC, Flh53 et Flh41 sélectionnées pour l'étude du BI	77
Tableau 2 : Symptômes de BI des 4 variétés : MD2, SC Flh53 et Flh41	
soumis au traitement au froid en post-récolte (TPR).....	82
Chapitre 2, article 1	
Tableau 1 : Ascorbic acid content at harvest in different pineapples varieties	95
Chapitre 3, article 2	
Tableau 1: Primer sequences of five references genes and two target genes used in qPCR experiments in pineapple fruits.....	117
Chapitre 4	
Tableau 1: Amorces spécifiques pour les gènes codant l'APX et l'actine.....	159
Discussion Générale	
Tableau 1 : Portrait des variétés MD2 et SC	179

SOMMAIRE

PARTIE 1 : Synthèse bibliographique	13
1. <i>Ananas comosus</i> (L) M.....	13
1.1 Caractéristiques	13
1.1.1 Classification botanique et origine.....	13
1.1.2 Morphologies et particularités physiologiques	13
a) Généralités	13
b) De l'inflorescence au fruit	15
1.2 La culture de l'ananas.....	17
1.2.1 Les conditions de culture	17
a) Climat.....	17
b) Pédologie.....	17
1.2.2 L'itinéraire technique	18
a) Préparation du sol.....	18
b) La plantation	19
c) Irrigation et traitements	20
1.3 L'ananas dans le monde et les enjeux de l'exportation.....	21
1.3.1 Historique et leader de production	21
1.3.2 Ananas transformés et ananas frais.....	21
1.3.3 Les tendances du marché.....	22
1.4 Diversité variétale et critères de qualité des fruits	23
1.4.1 Les variétés d'ananas et leurs particularités.....	23
1.4.2 Sélection variétale et critères de qualité des fruits	24
1.4.3 Les contraintes liées à l'exportation des fruits frais	24
2 Le brunissement interne de l'ananas	25
2.1 Généralités	25
2.1.1 Les conditions de brunissement	25
2.1.2 Impact économique du brunissement.....	26
2.2 Les symptômes du BI	26
2.3 Les gènes et enzymes associés au BI	27
2.3.1 Synthèse et oxydation des phénols	27
a) Les composés phénoliques (polyphénols).....	27
b) La phénylalanine ammonia-lyase (PAL, EC 4.3.1.5).....	28
c) Les Polyphenols oxidases (PPO, EC 1.14.18.1 et EC 1.10.3.1)	29
d) Les peroxydases (POD, EC 1.11.1.7).....	32
2.3.2 Les enzymes antiradicalaires.....	32
2.4 Les facteurs influençant le brunissement interne.....	33
2.4.1 Les hormones	34
a) Ethylène	24
b) La gibbérelline	24
2.4.2 Les composés chimiques	35
a) Le calcium.....	35
b) L'acide ascorbique.....	35
2.5 Les méthodes pour inhiber ou limiter le BI	35
2.5.1 Les traitements chimiques	36
a) Les traitements thermiques.....	36
b) Atmosphère contrôlée et conditions de stockage.....	36
2.5.3 L'amélioration variétale	37
3 La contrainte au froid	37
3.1 Les conditions	37
3.2 La contrainte au froid : « chilling stress ».....	38
3.2.1 Généralités	38
3.2.2 La stratégie adaptative des plantes au froid	39
3.2.3 Les réponses cellulaires et moléculaires associées au « chilling stress ».....	42
a) Une modification des membranes.....	42

b) Altération de la structure du cytosquelette	43
c) Les phénomènes dégradatifs impliqués dans la balance anabolique/catabolique	44
4 La protéolyse chez les plantes.....	46
4.1 Les protéases des organites.....	46
4.1.1 Les fonctions protéolytiques	46
4.1.2 Mode d'action des protéases, classification et nomenclature	46
4.2 Les protéases à cystéine	48
4.2.1 Classification des protéases à cystéine	48
4.2.2 Un exemple de protéase à cystéine : la papaine	50
4.3 Les protéases à acide aspartiques	50
4.3.1 Classification.....	51
4.3.2 Site actif et mode d'action.....	52
4.3.3 Les fonctions des protéases à acide aspartiques	52
4.4 Régulation et inhibition des endoprotéases	53
4.4.1 Les inhibiteurs de protéases	53
4.4.2 La cystatine	54
a) Mode d'action et structure	54
b) Fonctions.....	55
PARTIE 2 : Matériel et Méthodes	57
1 Matériel végétal	57
1.1 Conditions de culture et de récolte des fruits.....	57
1.2 Les Traitements	58
1.3 Echantillonnages.....	59
2 Analyses physiologiques.....	59
2.1 Caractéristiques chimiques	59
2.1.1 Mesure d'extraits secs solubles.....	59
2.1.2 Mesure d'acidité titrable.....	59
2.2 Evaluation de l'intégrité des membranes cellulaires.....	60
3 Analyses biochimiques	60
3.1 Extraction des protéines et dosages enzymatiques	60
3.1.1 Extraction de protéines adaptées aux dosages enzymatiques de PPO, POD et APX.....	60
3.1.2 Dosage enzymatique et séparation de protéines	61
a) La polyphenol oxidase PPO	61
b) La guaiacol peroxidase POD.....	61
c) Séparation des protéines de PPO et POD en conditions non dénaturante.....	61
d) Milieu de révélation des activités protéiques PPO et POD	61
e) L'ascorbate peroxidase APX.....	62
3.1.3 Extraction des protéines et dosage enzymatique de la PAL	62
3.1.4 Extraction des protéines et dosage enzymatique des enzymes du catabolisme protéique	63
a) Dosage de la protéase à cystéine	63
b) Dosage de la protéase à acide aspartique.....	63
3.1.5 Dosage des protéines des extraits	64
4 Analyses moléculaires	64
4.1 Préparation des échantillons	64
4.2 Extraction des ARN totaux	64
4.3 Contrôle de la qualité et de la quantité d'ARN	65
4.3.1 Analyse quantitative des ARN totaux.....	65
4.3.2 Analyse qualitative des ARN totaux	65
4.4 Synthèse des ADNc par reverse transcription	65
4.5 Stratégie d'obtention de nouvelles séquences d'ADNc partiels	66
4.6 Dessin d'amorces pour la PCR semi quantitative et la PCR en temps réel	66
4.7 Amplification des gènes par PCR semi-quantitative.....	67
4.7.1 La réaction	67
4.7.2 Analyse des produits PCR	67
4.8 Clonage des produits d'amplification par PCR.....	68

4.8.1 Ligation des produits d'amplification PCR dans un vecteur de clonage	68
4.8.2 Préparations de bactéries compétentes	68
4.8.3 Transformations des bactéries compétentes	68
4.8.4 Préparation de l'ADN plasmidique	69
4.8.5 Séquençage d'ADN et analyse de séquences nucléotidiques.....	69
4.8.6 Amplification d'une séquence partielle d'ADNc par RACE	69
a) Amplification de l'extrémité 5' de l'ADNc de la protéase à acide aspartique	70
b) Amplification de l'extrémité 3' de l'ADNc de la protéase à acide aspartique	71
4.8.7 Amplification des gènes par PCR en temps réel qPCR	72
a) Etapes préliminaires permettant de normaliser l'étude qPCR	72
b) La réaction.....	72
c) Quantification relative de l'expression des gènes	73
Partie 2 Résultats.....	74
Chapitre 1 Mise au point d'un système expérimental.....	75
Chapitre 2 Article 1 Polyphenol oxidase and Peroxidase expression in Four Pineapple varieties (<i>Ananas comosus</i> L.) after chilling injury	84
Chapitre 3 Article 2 Postharvest chilling treatment induces distinct expression in fruit bromelain and cystatin in two pineapple (<i>Ananas comosus</i> (L) Merr.) varieties differing in their susceptibility to blackheart physiopathy	109
Chapitre 3 Article 3 A novel aspartic acid protease gene from pineapple fruit (<i>Ananas comosus</i> (L) Merr.): cloning, characterization, and relation to postharvest chilling stress.....	132
Chapitre 4 Etude préalable de l'implication de l'ascorbate peroxidase et de la phenylalanine ammonia-lyase dans le brunissement interne de l'ananas et mise au point d'outils moléculaires	153
Discussion générale	168
Références	181
Annexes	199

INTRODUCTION GENERALE

L'ananas (*Ananas comosus*. (L). M) est le troisième fruit tropical le plus produit après la banane et le citron (Uriza-Avila *et al.*, 2005). Il représente 25 % de la production mondiale des fruits tropicaux de 82,7 millions de tonnes en 2008 (Yacob. 2010). L'ananas est un fruit consommé frais ou transformé (jus, conserves, confitures...) qui possède des qualités nutritionnelles de part sa teneur élevée en manganèse, en vitamines B1, C et en fibres. De plus il présente des qualités organoleptiques intéressantes, avec un bon rapport sucre/acidité à maturité, très appréciées par les consommateurs. L'ananas frais et les rejets de culture comme les couronnes sont riches en broméline. Cette protéase à cystéine possède de nombreuses propriétés thérapeutiques notamment en tant qu'anti-inflammatoire, anti-thrombique, agent fibrinolytique et anti-cancer (Bhattacharyya. 2008 ; Chobotova *et al.*, 2010).

Depuis quelques années un bouleversement de la filière « ananas » a été observé avec une demande en fruits frais grandissante d'où une importance économique réelle. Entre 1997 et 2008 la filière « ananas » des fruits frais a eu une exportation multipliée par 2,87 tandis que celle des ananas transformés était de 1,46 (Yacob. 2010). Dans ce contexte la filière ananas a été amenée à développer des stratégies de productions et d'exportation différentes. L'ananas en tant que fruit non climactérique doit être récolté au stade mûr, prêt à être consommé. C'est un fruit tropical hautement périssable qui doit être manipulé avec précaution et transporté dans les meilleures conditions afin d'éviter sa sénescence, sa dégradation par des agents pathogènes, ou des manipulations hasardeuses.

L'exportation des ananas par bateau, transport long, implique de disposer d'une technique de conservation. La plus répandue consiste à baisser la température de l'atmosphère de conditionnement des fruits (Laville. 1994). Or le froid déclenche chez l'ananas un désordre physiologique appelé brunissement interne de l'ananas (BI) ou cœur noir. Cette contrainte au froid peut survenir en conditions de post-récolte où les fruits sont soumis à de basses températures pendant le transport puis remis à une température plus élevée sur les étals (Teisson. 1972 ; Teisson et Combres. 1979 ; Paull et Rorhbach 1985). Egalement de basses températures au champ lorsque l'amplitude thermique entre le jour et la nuit est très élevée notamment en période hivernale peuvent induire le BI (Swete Kelly et Bagshaw. 1993 ; Lu *et al.*, 2011). Les symptômes de brunissement sont observables uniquement après la découpe des fruits et révèlent un brunissement de la chair les rendant impropre à la commercialisation et à la consommation. Le BI déclenche un rejet des consommateurs et une méfiance des

professionnels de la transformation des fruits (Swete Kelly et Bagshaw. 1993). Le BI a de lourdes conséquences économiques pour les pays producteurs. Il a été estimé annuellement en Australie que les pertes liées au BI sont de 1,3 millions de dollars USA pour une valeur de production d'environ 30 millions de dollars USA (Ko *et al.*, 2006). Il existe de nombreuses techniques visant à réduire ou inhiber le BI, toutefois elles ont une efficacité limitée et sont coûteuses. (Hu *et al.*, 2011 ; Lu *et al.*, 2011 ; Weerahewa et Adikaram. 2010).

Ce travail a porté essentiellement sur la comparaison de l'état physiologique d'ananas frais et celui d'ananas ayant subi un traitement de post-récolte : de 10 jours à 9°C et 10 jours à 25°C, correspondant au transport des fruits (10°C), puis à leur mise en vente (25°C).

Les objectifs de cette étude est de parvenir à une meilleure connaissance de la physiologie du BI de l'ananas dans le but de caractériser des marqueurs biochimiques et moléculaires de la résistance de l'ananas au BI, en vue de les insérer dans les programmes d'amélioration variétale de l'ananas pour la résistance au traitement de post-récolte.

Pour atteindre ces objectifs une mise au point du système expérimental a été réalisée sur 4 variétés d'ananas MD2, Smooth Cayenne (SC), et les hybrides Flhoran 41 et 53 (Flh41 et Flh53). Les critères organoleptiques de maturité des fruits ainsi que les dommages aux membranes en réponse au froid en post-récolte ont été évalués ([chapitre I](#)). Afin d'analyser l'implication des enzymes responsable de l'oxydation des phénols comme la polyphénol oxydase PPO et la peroxydase POD dans le BI, leurs activités enzymatiques et leurs isoformes ont été étudiées ([chapitre II](#)). L'expression de gènes et les activités enzymatiques correspondantes à la broméline de fruit (protéase à cystéine CP), à une protéase à acide aspartique AP et à une cystatine impliquées dans le catabolisme protéique ont été étudiées ([chapitre III](#)). Enfin une étude a été initiée sur l'implication dans le BI d'une enzyme anti-radicalaire, l'ascorbate peroxydase APX et d'une enzyme clé de la voie des phénylpropanoïdes, la phenylalanine ammonia-lyase PAL ([chapitre IV](#)). La mise au point d'outils moléculaires (ADNc partiels) codant des enzymes anti-radicalaires permettrons par la suite d'analyser finement la défense cellulaire vis-à-vis des radicaux libres générés par le traitement post-récolte.

PARTIE 1

Synthèse Bibliographique

PARTIE 1 : Synthèse bibliographique

1. *Ananas comosus* (L) M

1.1 Caractéristiques

1.1.1 Classification botanique et origine

L'ananas, *Ananas comosus* (L) M, appartient à l'embranchement des spermatophytes, au sous embranchement des Angiospermes, à la classe des monocotylédones, à la sous classe des Commelinidées, à l'ordre des poales, à la famille des Bromeliaceae, à la sous famille des Bromelioideae, au genre *Ananas* et à l'espèce *comosus* (Angiosperm Phylogeny Group III. 2009).

L'ananas actuel, *Ananas comosus* var *comosus* fut découvert par Christophe Colomb lors de son voyage en Guadeloupe en novembre 1493. Deux hypothèses quant aux origines de l'ananas sont trouvées dans la littérature (Bartholomew *et al.*, 2003b). La première hypothèse émise en 1919 par Bertoni suppose que l'ananas actuel dériverait d'un ananas sauvage ancestral *Ananas comosus* var *ananassoides*, qui aurait été domestiqué par les indiens Tupi-Guarani et qu'ils auraient transporté lors de leur migration vers les Antilles, le Nord des Andes et l'Amérique centrale. La deuxième hypothèse émise par Leal et Antoni (1981) situerait l'origine géographique de l'ananas au Nord de l'Amérique du sud dans une zone de 10°N-10°S de latitude et 55°-75°W de longitude et le sud du Brésil serait le second centre d'origine et de propagation de l'ananas.

1.1.2 Morphologies et particularités physiologiques

a) Généralités

L'ananas est une herbacée tropicale pérenne qui peut mesurer jusqu'à 1,50-2 m de hauteur (Figure 1). C'est également une plante xérophyte qui présente des caractéristiques morphologiques et métaboliques lui permettant d'être adaptée à une croissance en milieux secs : elle possède un métabolisme de plante de type 'Crassulacéen' CAM (Crassulacean acid metabolism). Celui-ci présente la particularité de séparer temporellement l'utilisation des voies C3 et C4 et permet la fixation du CO₂ à l'obscurité. Ceci évite l'ouverture des stomates pendant la journée et donc l'évapotranspiration. L'ananas possède un feuillage sessile, en

forme de gouttière, disposé en spirale, typique des plantes de la famille des broméliacées, permettant de recueillir l'eau au sein du feuillage (Figure 2). Les feuilles persistantes sont étroites, parfois dentées (selon les variétés), et lancéolées. Elles présentent un faible ratio surface d'échange/volume, possèdent un tissu aquifère en face supérieure et un duvet constitué d'excroissances ou trichomes en face inférieure, l'ensemble permettant de stocker et de retenir l'eau (Figure 2 et 3).

Le plant d'ananas présente deux types de racines adventives: des racines aériennes et des racines souterraines (Figure 4). Les racines aériennes, sont des racines subérisées qui s'enroulent autour de la tige et se situent à la base des feuilles permettant absorber l'eau recueillies par celles-ci. Les racines souterraines sont très fines, fragiles, et se développent superficiellement dans les 40 premiers cm du sol, pour optimiser l'absorption de l'eau.

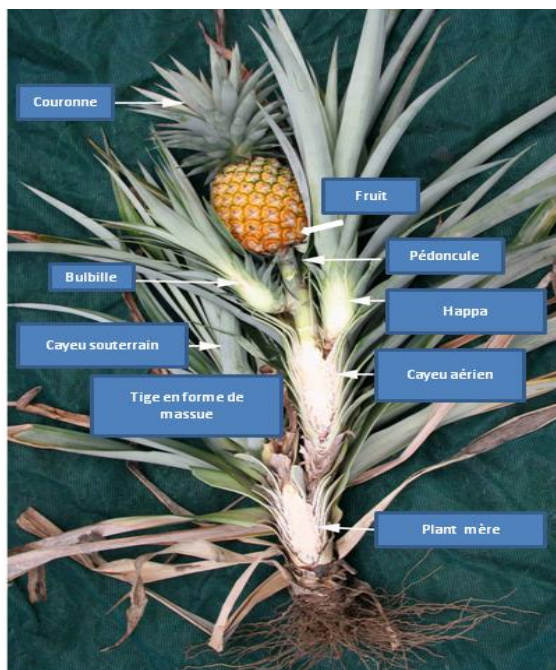


Figure 1 : Aspect général d'un plant d'*Ananas comosus*
(d'après pineapple best practice manual. 2009)

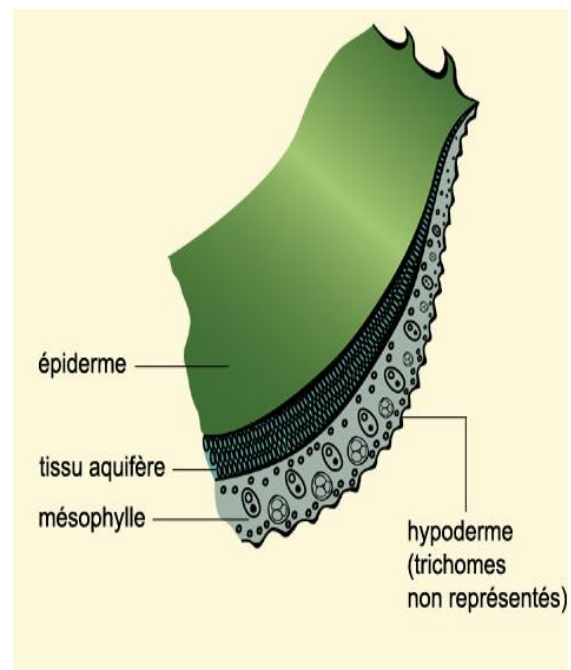


Figure 2 : Représentation schématique d'une portion de feuille d'ananas
(<http://www.afd-ld.org/plant-ch/ananas/lignecl/i-ana-feuille.htm>)

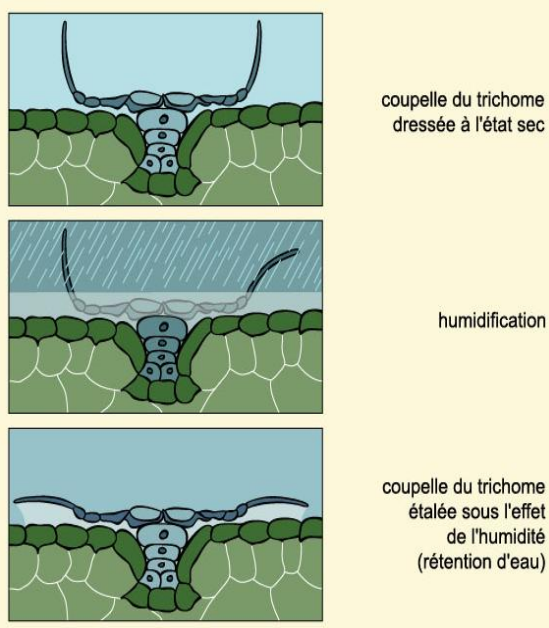


Figure 3: Fonctionnement d'un trichome de feuille d'ananas

(<http://www.afd-ld.org/plant-ch/ananas/lignecl/i-ana-trich.htm>)

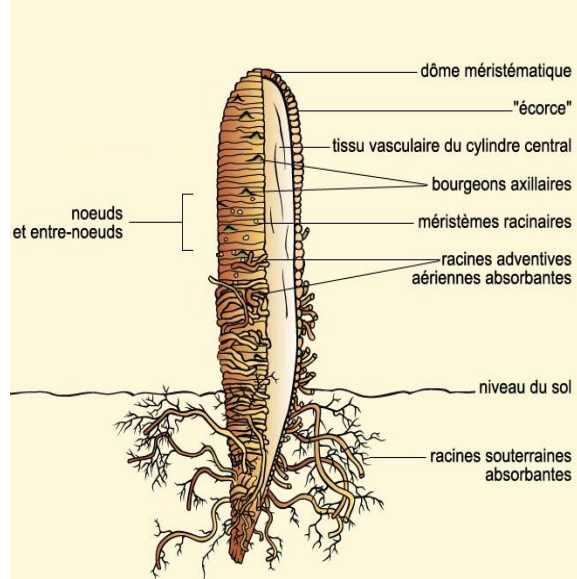


Figure 4 : Cylindre central d'un plant d'ananas

(<http://www.afd.be/~plant-ch/ananas/lignecl/i-ana-racine.htm>)

La tige est courte, en forme de massue et porte une inflorescence composée de nombreuses fleurs disposées en spirales (Figure 4 et 5).

b) De l'inflorescence au fruit

L'inflorescence de l'ananas est ovoïde et de couleur rose-violet (Figure 5). Elle est constituée d'un ensemble de fleurs sessiles, individuelles, hermaphrodites, de type 3, disposées en spirale sur le pédoncule du plant. Chaque fleur possède une bractée qui protège les pièces florales et un ovaire infère composé de 3 loges carpellaires, à placentation axile (Figure 6).

L'ananas est un fruit composé, surmonté d'une couronne de feuilles (Figure 1). Il est constitué d'un groupement de petits fruits individuels appelés « œil », disposés en unités morphologiques hexagonales (Figure 7). L'ananas est un fruit parthénocarpique puisqu'il n'est pas obtenu à la suite d'une fécondation mais est le résultat de la fusion de multiples

fleurs devenues charnues et soudées les unes aux autres autour de la tige formant alors un syncarpe (Figure 8). L'ananas est également considéré comme étant une infrutescence de baies où l'axe de l'inflorescence, la bractée florale et les ovaires infères des fleurs sont soudées (Figure 8). L'ananas est un fruit autostérile, c'est-à-dire que le pollen d'une variété ne peut pas féconder les ovules d'une même variété. Ainsi l'ananas ne comporte généralement pas de graines, bien que dans de rares cas une fécondation puisse se produire notamment lors de croisements inter variétaux utilisés dans des programmes d'améliorations.



Figure 5 : Fleurs d'ananas Cayenne

(http://caribfruits.cirad.fr/fruits_des_antilles/ananas)

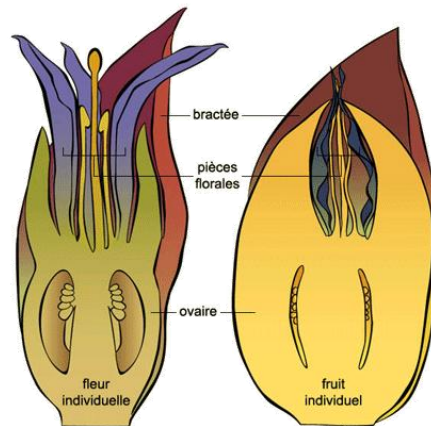


Figure 6 : Fleur et fruit individuelle d'ananas

(<http://www.afd-ld.org/>)

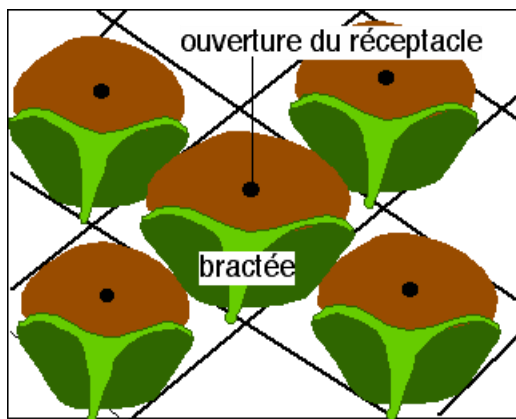


Figure 7 : Unités morphologiques des yeux d'ananas

(<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Fruits/ananas.htm>)

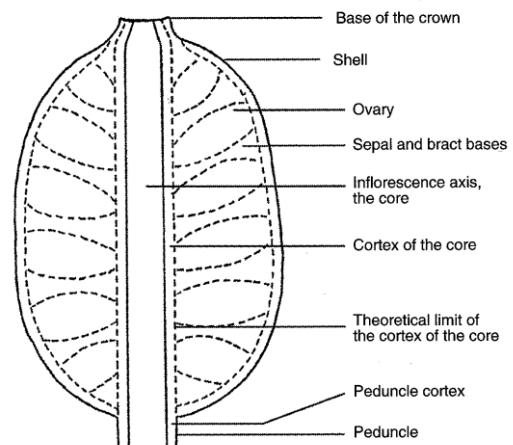


Figure 8 : Morphologie de la coupe longitudinale d'un ananas (d'Après Okimoto. 1948)

1.2 La culture de l'ananas

La culture de l'ananas (ou « karatas ») a été décrite pour la première fois à la fin du 17^{ème} siècle par Charles Plumier sur l'île d'Hispaniola située entre Cuba et Puerto Rico. Elle fut introduite aux Antilles, en Inde puis progressivement à l'ensemble de la zone tropicale grâce aux liaisons maritimes (Bartholomew *et al.*, 2003b).

Actuellement l'ananas est cultivé dans toutes les zones tropicales et subtropicales du monde avec environ 20,5 millions de tonnes produites en 2008. Les deux plus gros producteurs d'ananas sont : l'Asie, puis l'Afrique avec respectivement 10,14 et 2,4 millions de tonnes d'ananas (FAO, décembre 2009). L'exportation d'ananas frais en 2008 représente environ 2,5 millions de tonnes (Yacob. 2010).

1.2.1 Les conditions de culture

Elles varient beaucoup selon les variétés cultivées et les zones géographiques de productions. Ainsi la culture de la variété du Cayenne lisse (IRFA, 1984 ; COLEACP-UGPIP. 2009b), la variété la plus cultivée à travers le monde sera décrite.

a) Climat

La culture de l'ananas se répartit sur toute l'année, néanmoins il existe trois périodes climatiques dites « d'hiver », « de pluie » et « d'été » qui influent selon les variétés sur : la taille, la forme du fruit et de sa couronne, la couleur de la peau et de la chair des fruits mais également les qualités organoleptiques (Joomwong et Sornsrivichai, 2006). Ainsi la période d'été est plus favorable à la production de fruits car ceux-ci sont moins acides, plus parfumés, de plus grosse taille, par rapport aux fruits produits durant la période hivernale (Bartholomew. 2009 ; Liu *et al.*, 2011). En effet durant ces périodes l'hygrométrie et le nombre de degré jour d'ensoleillement varient beaucoup et expliquent ces disparités saisonnières (Teisson et Combres, 1979).

b) Pédologie

La fragilité des racines d'ananas nécessite que la culture des plants soit réalisée sur un sol meuble, aéré, à particules solides arrondies (www.colecap.org/pip). Celles-ci peuvent être sujettes à l'anoxie provoquée par un mauvais drainage du sol, ainsi un sol poreux à ressuyage

rapide est adapté à la culture de l'ananas. Un terrain de faible pente sera préféré afin de limiter le ruissellement et donc le lessivage du sol.

Le sol doit également présenter une profondeur suffisante d'environ 40 à 50 cm pour accueillir le développement des racines. Enfin il doit avoir une texture optimale de 60-70 % de sable, 10-20 % de limons, 10 à 20 % d'argiles et un pH d'environ 4,5 et 5,5 afin de limiter les risques de pourriture dues à phytophthora (www.colecap.org/pip).

1.2.2 L'itinéraire technique

Le cycle de l'ananas se déroule en 3 phases importantes : **la phase de croissance végétative**, qui comprend la plantation de plants d'ananas jusqu'à la différenciation d'une inflorescence dont on induit artificiellement la floraison (TIF); puis **la phase de fructification**, qui se termine à la récolte du fruit ; et enfin **une phase de production de rejets**, qui va de la fin de la récolte à la destruction des plants (IRFA, 1984).

a) Préparation du sol

En général, les résidus de cultures d'ananas précédentes sont brûlés ou enfouis profondément dans le sol afin de fournir un apport organique et d'éviter une infestation de pathogènes et ravageurs pour la future culture. Le sol est labouré sur 30 à 40 cm de profondeur, et parfois un ajout de pesticides est réalisé afin de prévenir l'infestation des champs par des ravageurs de cultures. Les rejets de culture (propagules) ou des vitroplants sont plantés en quinconce, sur des billons selon des lignes jumelées préalablement préparées (piquage du sol, trouaison...), avec environ 45 000 à 60 000 pieds/ha (www.colecap.org/pip)

Récemment la culture en champ utilise un paillage en polyéthylène à travers lequel est réalisée la plantation (Figure 9). Cette technique présente de nombreux avantages comme l'amélioration de la température, de l'humidité du sol, de la limitation de la pousse d'adventices. Néanmoins ce système est coûteux et peut se révéler néfaste en créant un environnement favorable au développement des parasites du sol.



Figure 9 : Plantation de rejets de cultures sur paillage en polyéthylène
(http://caribfruits.cirad.fr/fruits_des_antilles/ananas)

b) La Plantation

Les plantations d'ananas sont réalisées à partir d'un matériel végétatif appelé rejet de culture ou propagules. Il s'agit d'éléments issus de plantes mères appartenant à la culture précédente (Figure 1) comme les couronnes, les bourgeons axillaires de tiges (caieux, hapa), de pédoncules (bulbille) ou encore obtenus par des techniques *in vitro* (vitroplants).

En général bien que l'utilisation de vitroplants soit coûteuse, leur utilisation est préférée par les producteurs puisqu'ils garantissent une pureté variétale, un matériel végétal homogène et sain. Ils sont également utilisés pour leur résistance à la dessiccation, leur aptitude à la conservation et permettent une croissance homogène, rapide et facile pour une variété donnée.

Dans des conditions favorables à la croissance, 12 à 15 mois de culture sont nécessaires entre la plantation de propagules et l'obtention d'un fruit, plus 6 à 8 mois pour l'obtention de propagules, la destruction des vieux plants, le repos du sol et préparation de celui-ci avant une nouvelle plantation (Agrisol, 1992). Ces délais peuvent varier en fonction de différents paramètres tels que le matériel végétal utilisé pour la plantation (propagules ou vitroplants), la variété utilisée, le climat, le type de sol et l'itinéraire technique appliqué. Ainsi le temps entre 2 récoltes successives sur une même parcelle peut être de plus de 2 ans.

Selon le matériel végétal, différentes étapes sont menées, comme un tri et un traitement des plants avec un insecticide ou un fongicide pour les rejets ou les couronnes, et une phase d'acclimatation pour les vitroplants.

c) Irrigation et traitements

L'irrigation des parcelles d'ananas se fait par aspersion ou parfois par un système d'arrosage au pied des plants. Bien que ceux-ci possèdent une grande résistance à la sécheresse, une irrigation régulière et maîtrisée permet aux plants d'exprimer leurs potentialités et d'obtenir une culture rentable.

Le type de sol, pour la culture de l'ananas est assez pauvre en éléments nutritifs. Ainsi pour une conduite de culture efficace, des éléments nutritifs sont souvent ajoutés : azote, potassium et différents éléments minéraux pendant les 9 premiers mois de végétation des ananas.

L'induction florale de l'ananas, est un phénomène qui survient naturellement au champ selon certaines conditions comme des jours courts, des températures nocturnes basses (Min et Bartholomew, 1997) sur des plants d'âge et de robustesse suffisant pour porter les fruits (Van de Poel *et al.*, 2009). Certaines contraintes comme le déficit hydrique, ou encore les blessures des plants peuvent également déclencher une induction florale non contrôlée (Bartholomew et Malézieux, 1994 ; Bartholomew *et al.*, 2003a). Néanmoins dans le cadre de plantations à l'échelle industrielle, une homogénéité de la floraison, de la maturité des fruits, et de leur poids sont nécessaires à une gestion planifiée des récoltes. Ainsi une induction florale (TIF) est mise en place pour synchroniser la floraison et le développement des fruits, lorsque les plants sont aptes à supporter leur poids. Le traitement est réalisé au niveau du bourgeon terminal à l'aide de produits florigènes afin de stimuler artificiellement la floraison (Cunha, 2005). Les traitements sont généralement réalisés en fin de journée ou à la tombée de la nuit, afin que les gaz puissent pénétrer via des stomates ouverts. Couramment de l'éthylène C_2H_4 , est apporté via de l'éthylène mélangé à du charbon actif (Lebeau *et al.*, 2009), généré via l'application exogène d'éthéphon (l'acide 2-chloroéthylphosphonique) (Sheng-hui *et al.*, 2011) ou de carbure de calcium (CaC_2) produisant de l'acétylène lorsqu'il est mélangé avec de l'eau (Bartholomew *et al.*, 2003a ; Maruthasalam *et al.*, 2010). Une étude menée sur l'application d'éthéphon sur des plants d'ananas montre une augmentation de l'éthylène endogène induisant la floraison. Deux autres hormones sont utilisées conjointement : ABA et 2 iP (2 isopentyl) (Sheng-hui *et al.*, 2011). Par contre, de faibles teneurs en auxine (acide β -indolyl-3-acétique), acide gibbérellique (GA3) et zéatine (ZT) sont présentes lors de l'initiation de la floraison, et augmentent lors du développement de l'inflorescence (Sheng-hui *et al.*, 2011). Les variations des ratios hormonaux lors de l'induction florale contribuent à l'interruption de la phase végétative au profit de la phase florifère. Le contrôle de ces processus permet d'optimiser la production de fruits pour une même période au sein d'un

champ, de réduire les itinéraires techniques donc les coûts des récoltes et d'éviter les pertes et/ou les difficultés d'approvisionnement du marché (Min et Bartholomew, 1997 ; Wang *et al.*, 2007)

1.3 L'ananas dans le monde et les enjeux de l'exportation

1.3.1 Historique et leader de production

Les plantations et usines de transformations (ananas en boîte) étaient très développées avant la seconde guerre mondiale à Hawaï. Entre 1950 et 1960 la pression de pays producteurs comme les Philippines et la Thaïlande devient telle que les prix des ananas en boîte chutèrent et le marché ne fut plus assez rentable. Ainsi, progressivement les grandes firmes hawaïennes comme Del monte et Dole fermèrent leurs usines de transformation ou les délocalisèrent en Asie. Pour les producteurs d'ananas hawaïen, il fallut alors reconvertir la production vers l'ananas frais. Plusieurs problèmes se posèrent alors pour la réorganisation du planning de production des ananas qui était adapté à la transformation des ananas en boîte en été et faisait appel à des travailleurs saisonniers (étudiants). De plus il fallait fournir le marché toute l'année. Or les ananas présentent une qualité fluctuante selon les saisons, étant médiocre en hiver (forte acidité) (Bartholomew, 2009). Ce problème majeur fut résolu par l'utilisation de la variété Cayenne lisse (Smooth Cayenne SC) dont la qualité est constante toute l'année. C'est ainsi que l'ensemble des producteurs et des firmes portèrent leur choix sur cette variété et en firent une stratégie commerciale, une norme : à l'exportation les ananas frais doivent ressembler à la variété Cayenne lisse.

1.3.2 Ananas transformés et ananas frais

La production mondiale d'ananas représente globalement (ananas transformés et frais) près de 25 % de la production mondiale de fruits tropicaux avec environ 82,7 millions de tonnes en 2008 (Yacob, 2010). L'Asie est le plus gros producteur d'ananas, avec plus de 50 % de la production mondiale en 2007 (FAO décembre 2009). L'exportation des ananas frais est un marché dominé par le Costa Rica et les Philippines. Tandis que la Thaïlande, l'Indonésie et les philippines exportent majoritairement des ananas transformés (boîte).

Les variétés cultivées diffèrent en fonction de leur utilisation (frais ou en boîte) excepté au Vietnam et en Malaisie où une seule variété est produite pour les deux types de marchés (FAO décembre, 2009).

En effet, pour les ananas transformés, les stratégies industrielles vont dicter le choix des variétés. Pour des ananas transformés en jus, ou destinés à la mise en boîte, ce sont préférentiellement des ananas à jus, à chair importante, avec des yeux peu profonds pour éviter d'être gênés lors des processus de préparations, par la présence de cupules floraux.

Pour les ananas « en frais », les critères d'aspect, de goût, de résistance au transport (exportation) vont primer. Cette catégorie d'ananas en frais, est d'une grande importance économique, puisque leur prix est beaucoup plus élevé que le prix d'achat des ananas destinés à la transformation. De plus leur exportation permet d'ajouter une plus value à l'ananas et se révèle d'une importance économique majeure pour les pays producteurs. Ainsi l'exportation de fruits frais correspond en 2008 à un marché de 1,39 milliard de dollars tandis que les ananas transformés ont généré pour la même année 870,8 millions de dollars (Yacob, 2010).

1.3.3 Les tendances du marché

L'ananas est le troisième fruit tropical le plus produit après la banane et le citron (Uriza-Avila *et al.*, 2005). Le marché global de l'ananas indique une tendance positive puisque, la production d'ananas et les demandes (frais ou transformés) n'ont cessé d'augmenter (1997 : 0,87.10⁶ t ; 2007 : 2,5.10⁶ t). Depuis quelques temps le marché de l'ananas évolue vers une demande plus importante d'ananas frais. Les principaux importateurs sont les USA, Belgique, Norvège, le Japon et l'Allemagne. (Yacob, 2010).






De plus le marché de l'ananas subit actuellement un bouleversement de la demande et de production des variétés. Ainsi la variété Cayenne Lisse, produite et très exportée depuis des années, est progressivement supplantée par l'apparition de nouvelles variétés comme la variété MD2, mise sur le marché par Del monte dès 1990 sous la marque Del Monte GoldTM Extra Sweet Pineapple (FruiTrop, 2008). Cette dernière présente de meilleures qualités organoleptiques que la variété Cayenne Lisse, et est plus robuste.

1.4 Diversité variétale et critères de qualité des fruits

1.4.1 Les variétés d'ananas et leurs particularités

Il existe une multitude de variétés d'ananas à travers le monde, appréciées pour leurs qualités gustatives ou leurs caractéristiques ornementales. Les variétés d'ananas sont caractérisées par l'origine de leur production et également par les hybridations dont elles sont issues. La trentaine de variétés d'*Ananas comosus* trouvées sur le marché sont classées en 4/5 groupes : Cayenne, Spanish, Queen, Pernambuco (appelé encore Abacaxi ou Perola) et Mordilona (encore appelé Perolera ou Malpura). Seules quelques variétés sont exportées pour la consommation en frais. Cependant certaines variétés dont les qualités gustatives sont intéressantes, présentent peu d'aptitudes à la conservation et à la manipulation et sont réservées au marché local (FruiTrop. 2008). Il existe de nombreux cultivars et hybrides dont les qualités particulières et la description sont regroupées et répertoriées dans une banque de données (<http://collections.antilles.inra.fr/BRCPortal/initHome.do>), (Tableau 1).

Tableau 1 : Illustration des différents groupes d'ananas (D'après le centre de ressources biologiques, Horry. 2007, <http://collections.antilles.inra.fr/BRCPortal/initHome.do>.)

Groupe	Cayenne	Spanish	Queen	Pernambuco	Perolera
Illustrations					
Lieu de production	Monde	Région caribéenne Malaisie	Afrique du Sud Australie Réunion	Brésil Vénézuéla	Andes Colombie Equateur
Type de marché	Frais (local et export) Transformation	Frais (local et export)	Frais (local et export)	Frais (local)	Frais (local et export)
Sensibilité au BI	X		X		

1.4.2 Sélection variétale et critères de qualité des fruits

La production d'ananas est directement liée aux exigences du marché et des besoins exprimés par les consommateurs et les industriels. Ainsi la diversité des variétés cultivées et proposées sur le marché sont le reflet de stratégies commerciales, pour répondre au mieux à ces besoins que se soit localement, ou sur le plan international. La filière ananas doit s'adapter et alimenter le marché selon divers critères de qualité du fruit, de calibration pour leur transformation, d'acceptabilité par les consommateurs, du prix à la production et à l'exportation. La sélection variétale doit naturellement en tenir compte. Ainsi de nombreuses variétés ont été créées en réalisant des hybrides d'ananas appartenant aux 5 groupes connus (Cayenne, Spanish, Queen, Pernambuco et Perolera). Ces croisements visent à améliorer les performances agronomiques, morphologiques et les qualités organoleptiques des fruits. Ainsi les critères de qualité des fruits concernent des critères physiques (poids, taille, forme, texture, couleur) ; physico-chimiques (pH, acidité titrable), chimiques (sucres solubles, acides organiques) biochimiques (fibres, protéines solubles), organoleptiques (apparence, saveur, odeur, couleur, fermeté). Il faut également tenir compte de leur aptitude à résister aux manipulations lors de la récolte, aux pathogènes, aux ravageurs, et présenter une bonne conservation au froid. Enfin, une diversification variétale a été mise en place pour contrecarrer la culture monovariétale du Cayenne Lisse afin de parvenir à une qualité meilleure des fruits destinés à l'exportation.

1.4.3 Les contraintes liées à l'exportation des fruits frais

L'ananas est un fruit complexe du point de vue économique. En effet, bien que le planning de production soit géré grâce à une induction florale artificielle, il arrive très souvent qu'au sein d'une même parcelle une disparité du stade de maturité des fruits se produise. L'ananas est un fruit non-climactérique dont la maturation est indépendante d'une synthèse d'éthylène, et n'est pas associée à une augmentation de la respiration des tissus. Ainsi, l'homogénéité de la date de production est un critère de qualité, puisque l'ananas, en tant que fruit non-climactérique, ne peut plus mûrir une fois récolté. Ainsi il est difficile d'obtenir une concentration en sucre et une acidité adéquates qui lui confèrent ses qualités gustatives en dehors de la phase de maturité sur plant. De plus la sénescence et une perte de la qualité des fruits apparaissent rapidement après la récolte (avant 10 jours) et seront plus ou moins rapides en fonction des conditions de transport des fruits, de l'emballage, des manipulations, et du

stockage. Ces paramètres doivent être pris en compte dans la gestion des marchés de l'ananas frais.

La production d'ananas frais sur le marché local ne suffit pas à rendre une exploitation rentable, l'exportation des fruits est donc nécessaire. L'acheminement des fruits par avion, permet de laisser les fruits mûrir plus longtemps sur pied avant leur récolte. Cependant ce mode de transport est coûteux, il est donc marginal. Le transport par bateau reste majoritaire. Bien qu'économiquement très intéressant, il présente un inconvénient majeur : la durée excessive de transport d'où la perte de qualité des fruits. En effet les fruits acheminés par bateau sont récoltés plus tôt pour mieux résister au transport, mais ils présentent alors des qualités organoleptiques médiocres et sont moins sucrés. De plus pour ralentir leur sénescence et l'attaque de pathogènes, différents traitements chimiques ou thermiques sont effectués. Un traitement très utilisé pour ralentir la sénescence inévitable des fruits est le traitement des fruits au froid, appelé encore réfrigération (Laville. 1994). Or ce traitement thermique, sous certaines conditions, provoque le brunissement interne de l'ananas.

2 Le Brunissement interne de l'ananas BI

2.1 Généralités

2.1.1 Les conditions du brunissement

Le brunissement interne de l'ananas (BI) « internal browning » est un processus enzymatique différant du brunissement non enzymatique lié à la réaction de Maillard, utilisée très souvent dans l'industrie agroalimentaire. Le brunissement interne de l'ananas, encore appelé communément cœur noir, ou tâches brunes internes est un désordre physiologique provoqué par une exposition des ananas à des températures fraîches en champ, notamment pendant les nuits hivernales. Ce phénomène est souvent observé en Australie et en Chine où pendant l'hiver l'amplitude thermique entre la nuit et le jour est très importante (Swete Kelly et Bagshaw. 1993; Lu *et al.*, 2011). Le BI apparaît également lorsque les fruits sont soumis en post-récolte à de basses températures de l'ordre de 0 à 21°C, puis transférés à de plus fortes températures (25°C). (Teisson et Combres. 1979 ; Paull et Rorhbach 1985). Cette contrainte thermique est appelé « postharvest chilling stress ».

2.1.2 Impact économique du brunissement

Le phénomène de BI a été décrit sur l'ananas dès 1951 par Miller. Il est responsable de pertes économiques très importantes, que se soit au niveau de la production d'ananas pour la transformation (en boîtes), pour le marché local de fruits frais ou pour l'exportation (Swete Kelly et Bagshaw. 1993). En Australie par exemple, le BI provoque annuellement une perte de 1,3 millions de dollars USA sur une valeur de production d'environ 30 millions de dollars USA (Ko *et al.*, 2006). Le BI est un frein à l'expansion de la production, et au développement du marché de l'ananas car il provoque un rejet des consommateurs et une méfiance des industriels de la transformation (Swete Kelly et Bagshaw. 1993).

2.2 Les symptômes du brunissement interne de l'ananas BI

Les anomalies déclenchées par le froid chez les fruits tropicaux comme la banane, la mangue, la goyave, et les agrumes sont généralement visibles extérieurement : altérations de l'aspect de la peau des fruits et apparition de ponctuations brunes, rougeâtres sur leur épiderme, plus ou moins confluentes, superficielles ou déprimées (Laville. 1994). Néanmoins, chez l'ananas le froid déclenche des symptômes de BI particuliers puisqu'ils ne sont visibles qu'au moment de la consommation des fruits ou de leur utilisation pour la transformation (lors de coupes longitudinales). En effet, aucun critère externe ne permet de discriminer un fruit sain, d'un fruit atteint par le BI, que se soit au niveau de la couronne du fruit, de sa coloration ou de l'aspect de l'épiderme (Teisson et Combres. 1979).

Les premiers symptômes décelés correspondent à la présence de petites lentilles grisâtres, auréolées d'une zone translucide au point d'attache des yeux sur le cylindre central du fruit. Puis les auréoles translucides brunissent légèrement notamment au niveau des vaisseaux. Les tâches tendent à s'étendre, fusionnent, la couleur brune de la chair s'intensifie et progresse longitudinalement et transversalement le long du cœur du fruit (Teisson et Combres, 1979 ; Smith. 1983). A un stade avancé du BI les $\frac{3}{4}$ du fruit présentent une chair brunâtre (Figure 10).



Figure 10 : Symptômes de brunissement interne de l'ananas au stade final (Laville. 1994)

2.3 Les gènes et enzymes associés au brunissement interne de l'ananas BI

Les enzymes majeures impliquées dans le BI sont responsables de la synthèse et de l'oxydation des phénols et l'inactivation des radicaux libres (enzymes anti-radicalaires) (Zhou *et al.*, 2003a).

2.3.1 Synthèse et oxydation des phénols

a) Les composés phénoliques (polyphénols)

Les composés phénoliques (polyphénols) sont des métabolites secondaires des végétaux. Ils contiennent un ou plusieurs cycles benzéniques et des groupements hydroxyles (Urquiaga *et Leighton*. 2000). Il existe de nombreux polyphénols (Figure 11), parmi lesquels deux familles sont importantes chez les fruits tropicaux : les catécholamines synthétisées à partir de la tyrosine sont peu étudiées et les phénylpropanoïdes sont synthétisés à partir de phénylananine via l'intervention de la phénylalanine ammonia-lyase PAL (Rinaldo *et al.*, 2010).

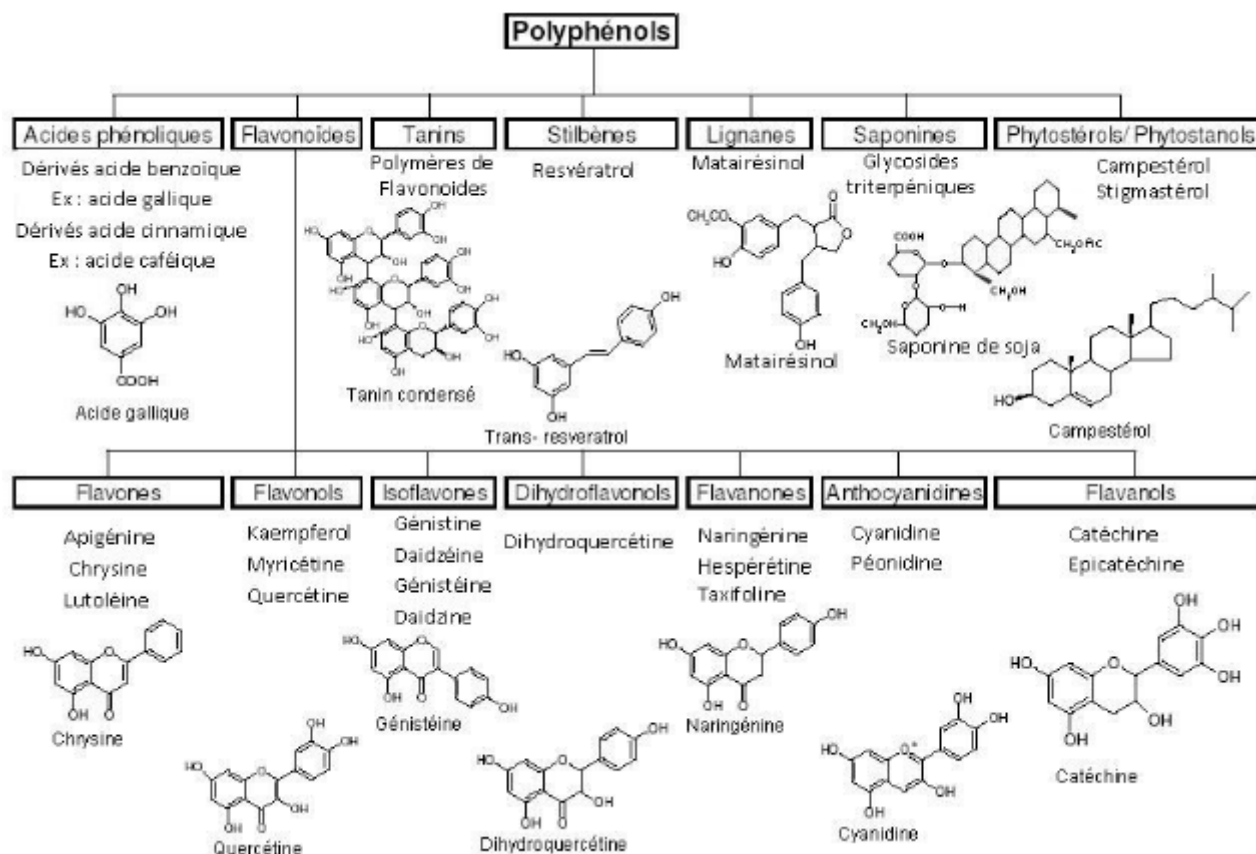


Figure 11 : les différents polyphénols (Bessas. 2008)

Particulièrement chez l'ananas les flavonols sont les plus présents notamment la quercétine et la morine (Lako *et al.*, 2007). Les polyphénols interviennent dans les composantes organoleptiques (couleur, astringence, amertume), nutritionnelles et fonctionnelles des fruits (Macheix *et al.*, 2005 ; Rinaldo *et al.*, 2010). De nombreuses études ont montré que ces composés pouvaient avoir une fonction protectrice en réponse à diverses contraintes biotiques et abiotiques (Dixon et Paiva. 1995). Une augmentation de la teneur en composés phénoliques comme la coumarine, les acides caféiques et féruliques a été trouvée dans des ananas atteints par le BI (Van Lelyveld et De Bruyn. 1977).

b) La phénylalanine ammonia-lyase (PAL, EC4.3.1.5)

La PAL est une enzyme clé dans la voie de synthèse des composés phénoliques (Jones. 1984). Elle intervient notamment dans la première étape de la voie de synthèse des phénylpropanoïdes en réalisant la conversion de la L-phénylalanine en acide trans-cinnamique (Figure 12).

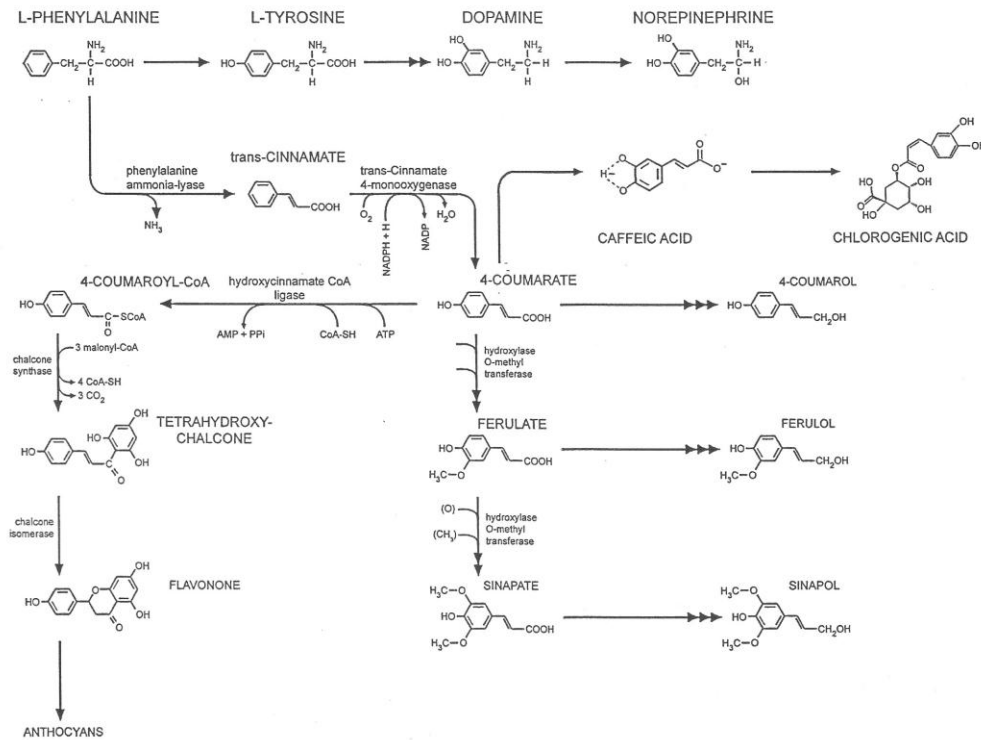


Figure 12 : voie de synthèse simplifiée des phénylpropanoïdes faisant intervenir la phénylalanine ammonia-lyase (Kulma et Szopa. 2007)

Son activité détermine la quantité et la nature des polyphénols synthétisés. Une synthèse *de novo* de la PAL serait stimulée en réponse à diverses contraintes (Dixon et Paiva. 1995), comme les blessures (Salman *et al.*, 2008), les irradiations aux UV (De Paolis *et al.*, 2008) et les basses températures (Chen *et al.*, 2008). L'induction de l'activité de la PAL est concomitante avec le développement de symptômes liés au froid chez les agrumes (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2000), les caramboles (Pérez-Tello *et al.*, 2001) et les mangues (Chidtragool *et al.*, 2011). Récemment une augmentation de l'activité de la PAL a été mise en évidence chez les ananas atteints par le BI (Zhou *et al.*, 2003a).

c) Les polyphénol oxydases (PPO, EC 1.14.18.1 et EC 1.10.3.1)

Les PPO sont des enzymes appartenant au groupe des oxydoréductases contenant deux atomes de cuivre (Macheix *et al.*, 2005). Elles sont souvent localisées au niveau de la membrane interne des chloroplastes, et sont séparées de leur substrat phénolique se situant majoritairement dans les vacuoles (Figure 13). Elles catalysent l'oxydation de composés phénoliques endogènes via l'oxygène moléculaire par l'intermédiaire de 2 types d'activités en

fonction du substrat phénolique oxydé (Figure 14). L'activité crésolasique (EC 1.14.18.1, ou monophénol oxydase), qui hydroxyle les monophénols en o-diphénols oxydés puis en o-quinones. L'activité catécholasique, (EC 1.10.3.1, ou diphénol oxydase), catalyse l'oxydation des o-diphénols en o-quinones. Les produits obtenus, les o-quinones peuvent se polymériser, se condenser et interagir avec différents groupements d'aminoacyles et des protéines cellulaires (Figure 15). Cette association brunit et colore en brun-noir les fruits et végétaux concernés (Mayer. 1987 ; Yoruk et Marshall. 2002). L'activité catécholasique est généralement responsable de la décoloration des fruits en post-récolte où la majorité des substrats sont des o-diphénols (Macheix *et al.*, 2005).

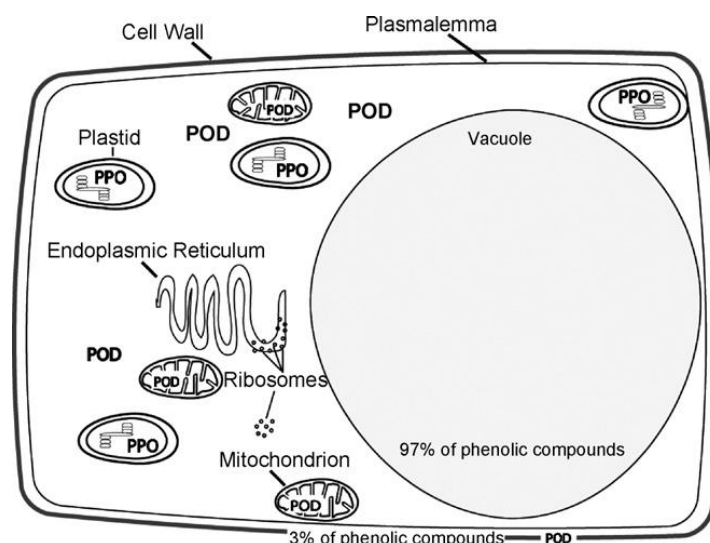


Figure 13 : Localisation des composés phénoliques et des enzymes d'oxydation PPO et POD dans une cellule végétale (Toivonen et Brummell. 2008)

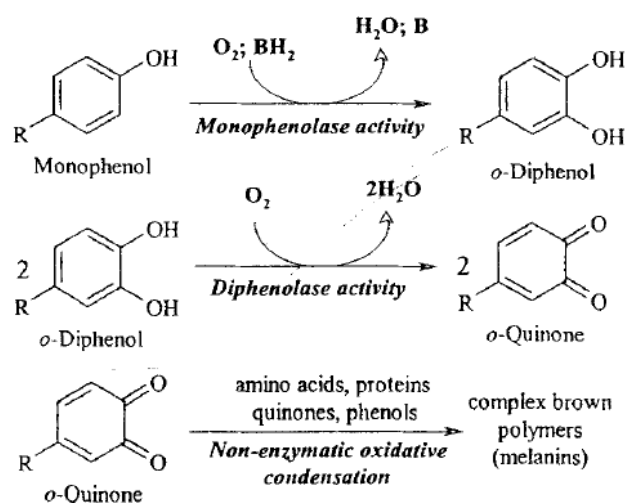


Figure 14 : Réaction d'oxydation des mono et diphénols par l'activité enzymatique de la PPO et processus non enzymatique de la formation de polymères bruns (Yoruk et Marshall. 2002)

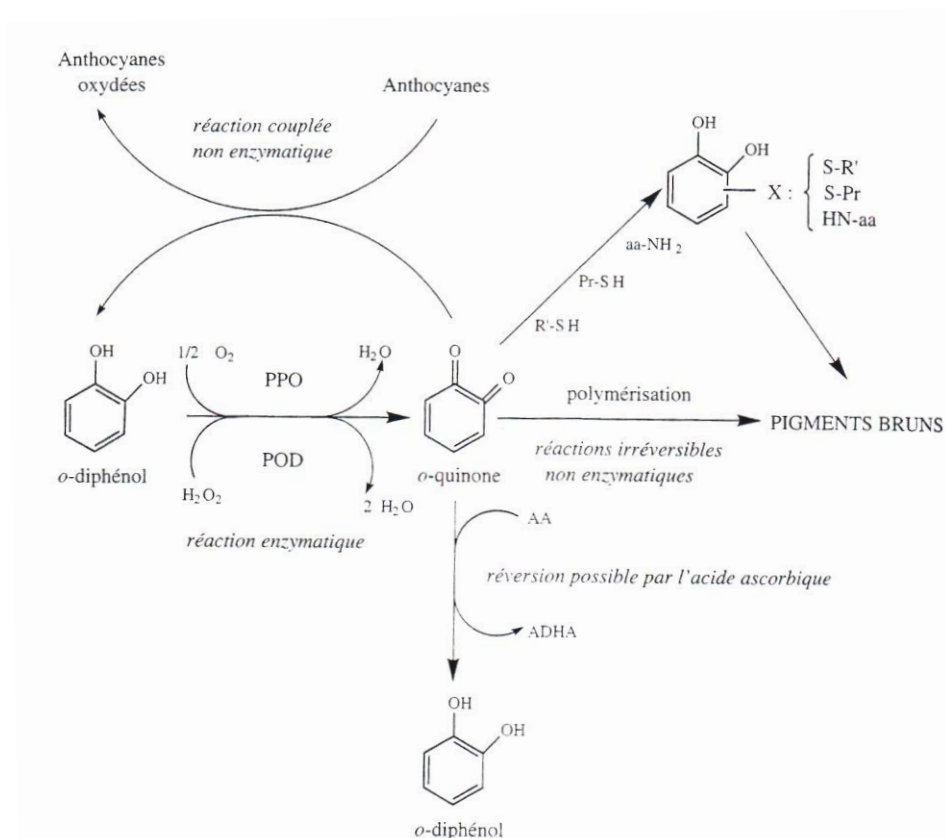


Figure 15 : Les étapes de brunissement des composés phénoliques (Macheix *et al.*, 2005)

PPO: polyphénol oxydases; POD : peroxydases, R'-SH : thiols; Pr-SH : protéines ; aa-NH₂ : acides aminés; AA : acide ascorbique; ADHA : acide déhydroxyascorbique

De nombreuses études ont montré qu'il existe une relation entre l'activité PPO et le brunissement interne de l'ananas (Teisson *et al.*, 1979; Paull et Rohrbach, 1985). Elle est 10 fois plus élevée dans des ananas présentant un BI que dans différents organes de la plante (feuilles, racines, inflorescence) ou même dans le fruit mature en conditions normales (Stewart *et al.*, 2001). Zhou et ses collaborateurs (2003a) ont confirmé l'implication de cette enzyme en corrélant spatialement et temporellement l'activité PPO au BI.

Une étude menée sur les gènes impliqués dans le BI suggère l'existence de 4 gènes codant la PPO chez l'ananas (Stewart *et al.*, 2001). Jusqu'à présent seulement deux gènes PINPPO1 et PINPPO2 ont été caractérisés (Stewart *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2003b). Ces gènes sont faiblement exprimés en conditions normales dans les différents organes et dans le fruit mature et le sont *de novo* en réponse au froid (Stewart *et al.*, 2001). L'expression de ces gènes est également stimulée en réponse aux blessures (Zhou *et al.*, 2003b). Ces résultats ont été

confirmés via l'étude de leurs promoteurs, dont l'activité est faible en conditions normales et inductible par des blessures ou par le froid (Zhou *et al.*, 2003b).

d) Les peroxydases (POD, EC. 1.11.1.7)

Les POD sont des enzymes héminiques très répandues chez les végétaux. Elles peuvent catalyser plusieurs réactions comme des peroxydations, des oxydations et des hydroxylations (Macheix *et al.*, 2005). Les POD sont des enzymes anti-radicalaires qui utilisent le peroxyde d'hydrogène comme receveur d'électrons et participent à la détoxification des cellules. Elles peuvent également agir en synergie avec les PPO dans l'oxydation des composés phénoliques et contribuer à la décoloration des fruits en post-récolte (Figure 15). Les POD sont localisées principalement au niveau du cytoplasme et dans les mitochondries (Figure 13).

L'implication des peroxydases dans le BI de l'ananas est sujette à controverses. L'activité POD augmente suite à une contrainte au froid chez les ananas développant des symptômes de BI (Paull et Rohrbach. 1985; Van Lelyveld *et al.*, 1991; Selvarajah *et al.*, 2000; Weerahewa et Adikaram. 2005). D'autres études montrent au contraire aucune variation de l'activité POD dans ces conditions (Van Lelyveld et De Bruyn. 1977; Zhou *et al.*, 2003a).

2.3.2 Les enzymes anti-radicalaires

Les enzymes anti-radicalaires comme la catalase CAT (EC, 1.11.1.6), l'ascorbate peroxidase APX (EC 1.11.1.11), la superoxide dismutase SOD (EC, 1.15.1.1) ainsi que des molécules non enzymatiques : vitamines A, C, E, glutathion et différents pigments (carotène, xeaxanthine, xanthophylle) participent à la détoxification des cellules en éliminant les espèces réactives de l'oxygène EAO comme O_2 , H_2O_2 , O_2^- , HO^{\cdot} , (Figure 16) (Gill et Tuteja. 2010 ; Latowski *et al.*, 2010 ; Foyer et Noctor. 2011).

Le système anti-radicalaire (enzymatique ou non) régule les EAO accumulées au cours du métabolisme normal des cellules (Foyer et Halliwell. 1976 ; Foyer et Noctor. 2005 et 2009), mais également lorsque les plantes sont soumises à des contraintes biotiques ou abiotiques (Ferrari-Iliou *et al.*, 1994 ; Foyer et Noctor. 1998; Mittler. 2002 ; Cruz de Carvalho. 2008 ; Miller *et al.*, 2010). Les EAO peuvent jouer un rôle de messenger secondaire dans les voies de

signalisation en réponse aux contraintes mais sont toxiques à forte doses, endommagent les macromolécules (Gill et Tuteja. 2010) et perturbent les réactions du métabolisme cellulaire (Miller *et al.*, 2010).

Il semble que l'APX soit impliquée dans le BI, puisqu'une baisse significative de l'activité enzymatique est observable lorsque des ananas sont atteints par le BI. Cela ne semble pas être le cas pour la CAT, qui ne varie pas (Zhou *et al.*, 2003a).

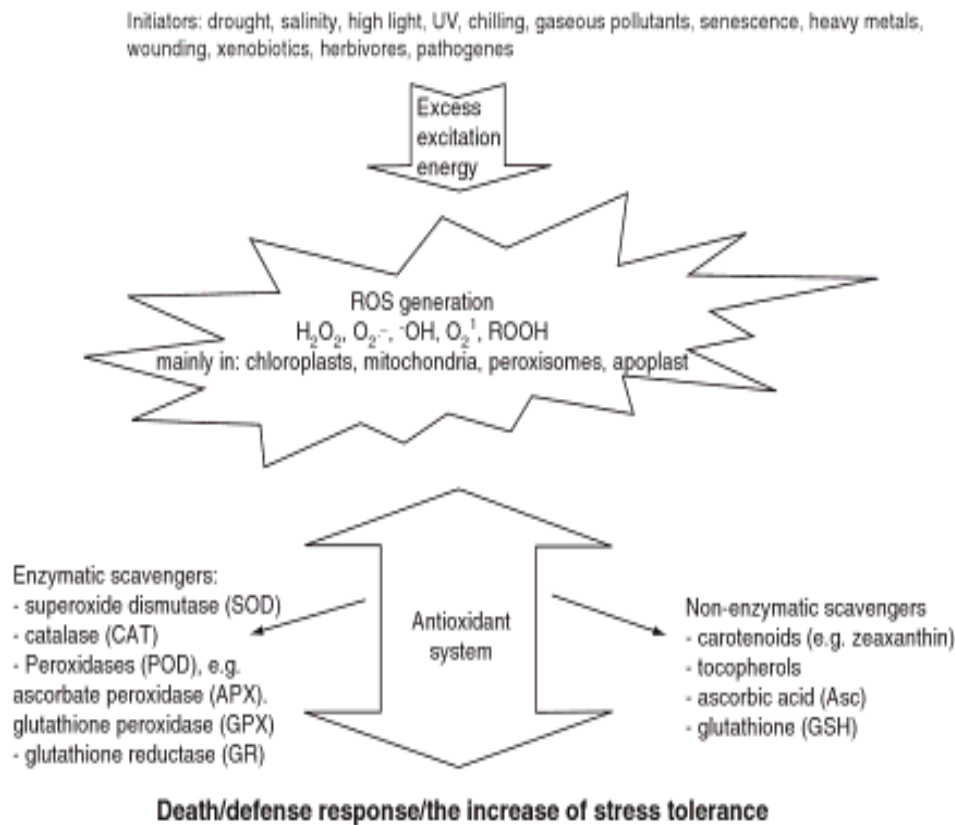


Figure 16 : Réponse des plantes aux contraintes biotiques et abiotiques via la régulation des EAO (ou reactive oxygen species ROS) par un système de régulation enzymatique et non enzymatique (Latowski *et al.*, 2010).

2.4 Les facteurs influençant le brunissement interne

Le BI de l'ananas est sous la dépendance de diverses hormones (éthylène et gibbérelline), du signal calcium et de l'acide ascorbique.

2.4.1 Les hormones

a) L'éthylène

L'éthylène est une hormone intervenant dans de nombreux processus biologiques comme la maturation des fruits climactériques ou encore dans la sénescence des feuilles (Lavis, 1994 ; Cara et Giovannoni. 2008). Souvent la production d'éthylène par les tissus ou organes des plantes est utilisée comme indicateur de contrainte. Bien que variant selon différents paramètres comme le type de tissu et l'espèce considérée, le froid ou une condition de retour à températures ambiantes tend à augmenter la production d'éthylène (Corbineau *et al.*, 1990).

Jusqu'à présent aucune corrélation directe n'a été démontrée entre l'éthylène et le BI. Pourtant une étude menée sur l'inhibition de la perception de l'éthylène au niveau de ses récepteurs, via le 1 méthylcyclopropène (1-MCP), a montré que l'étape de perception de l'éthylène était nécessaire au développement de symptômes de BI (Selvarajah *et al.*, 2001).

b) La gibbérelline

Les gibbérellines sont des hormones impliquées dans les processus biologiques comme la croissance des entre nœuds, la levée de dormance des graines ou encore dans le débourrement des bourgeons (Yamaguchi. 2008).

L'acide gibbérellique (GA3), peut induire le BI de l'ananas, en agissant au niveau des promoteurs des gènes PINPOO1 et PINPOO2 dont les activités enzymatiques correspondantes sont impliquées dans le BI (Zhou *et al.*, 2003 b). En effet, leurs promoteurs possèdent une séquence *cis* homologue à la séquence GARC (Gibberellic acid responsive element) inductible par la gibbérelline (Zhou *et al.*, 2003b). D'ailleurs, une application GA3 induit le BI sans traitement des fruits au froid (You-Lin *et al.*, 1997 ; Zhou *et al.*, 2003b). Par contre le paclobutrazol, inhibiteur de la synthèse d'acide gibbérellique, n'a pas d'incidence sur la diminution des symptômes de BI (O'hare *et al.*, 2002).

2.4.2 Les composés chimiques

a) Le calcium

Le calcium est un messager secondaire qui intervient dans différents aspects du métabolisme cellulaire, comme la conservation de l'intégrité des parois et des membranes cellulaires, la perméabilité sélective des cellules, la division cellulaire via l'assemblage des microtubules (Poovaiah. 1988; Bush. 1995; Conn et Gilliam. 2010 ; Dood *et al.*, 2010). Les ananas présentent des concentrations de calcium variables que se soit entre variétés ou au sein d'une même variété. En effet le cœur de ceux-ci présente une concentration plus faible en calcium que la chair des fruits (Hewajulige *et al.*, 2003).

Après une contrainte au froid, la concentration en calcium cellulaire est corrélée négativement à la sensibilité des ananas au BI, ainsi les variétés sensibles aux BI présentant de faible taux de calcium (Yuen *et al.*, 1994 ; Hewajulige *et al.*, 2003), et inversement la pulpe d'ananas exempte de BI présente une forte concentration en calcium (Hewajulige *et al.*, 2003).

b) L'acide ascorbique

L'acide ascorbique est un antioxydant phénolique. En effet en présence d'acide ascorbique les quinones peuvent être convertie en o-diphénols et libérer de l'acide dehydroxyascorbique ADHA (Figure 15). Ainsi une forte teneur en acide ascorbique peut prévenir l'apparition de symptômes de brunissements (Macheix *et al.*, 2005).

En effet des études montrent une diminution de la teneur en acide ascorbique dans les fruits atteints par le BI (Van Lelyveld et De Brun. 1977 ; Teisson *et al.*, 1979a). Pourtant ces observations diffèrent en fonction des variétés considérées (Teisson *et al.*, 1979a).

2.5 Les méthodes pour inhiber ou limiter le BI

L'objectif de ces méthodes est de retarder, de réduire voire d'inhiber le BI. Certaines sont actuellement en cours d'expérimentation et n'ont pas encore été appliquées en routine pour l'exportation des fruits. Cependant l'efficacité de ces traitements reste limitée car ils ne permettent pas d'inhiber totalement le BI, à moindre coût.

2.5.1 Les traitements chimiques

Le traitement des ananas par du 1-méthylcyclopropène (1 MCP) en post-récolte permet d'inhiber le BI, pendant 3 semaines et de réduire de 20 % l'incidence et l'intensité des symptômes après 4 semaines d'expérimentation (Selvarajah *et al.*, 2001).

Une application de calcium sous différentes formes permet également de réduire le BI : association de chlorure de calcium et de cire appliqués en post-récolte (Hewajulige *et al.*, 2006) ; CaO, CaSO₄, CaCl₂ appliqués en champ sur des plants 6 semaines ou sur des plants bourgeonnants d'un mois (Selvarajah *et al.*, 1998; Hewajulige *et al.*, 2006).

L'application de potassium en pré-récolte permet une réduction du BI dans le cas d'ananas de maturités différentes, corrélée à une baisse progressive des activités PPO, PAL et POD (Soares *et al.*, 2005).

Une étude récente, montre que l'acide salicylique appliqué en pré-récolte et en post-récolte réduit significativement l'intensité du BI et est corrélée à une inhibition des activités PPO et PAL (Lu *et al.*, 2011)

2.5.2 Les méthodes non chimiques

a) Les traitements thermiques

Un traitement à 30-42°C inhibe partiellement l'établissement du BI en inactivant la PPO (You-Lin *et al.*, 1997). Cependant ce traitement accélère la sénescence des fruits, d'où un raccourcissement de leur durée de conservation. Une réduction du BI peut être obtenue par un de pré-traitement à 4°C pendant 60 min avant la mise au froid des fruits effectuée avant ou après un traitement à la chaleur. Egalement des périodes alternant un traitement au froid puis réchauffement des fruits permet de réduire le BI (Weerahewa et Adikaram. 2010).

b) Atmosphère contrôlée et conditions de stockage

Le traitement des fruits après récolte avec de la cire permet de limiter les échanges avec le milieu extérieur (barrière aux gaz), de réduire la consommation en acide ascorbique et le développement du BI (Rohrbach et Paull 1982 ; Wilson Wijeratnam *et al.*, 1993 ; You-Lin *et al.*, 1997 ; Hu *et al.*, 2011).

Le stockage des ananas dans un emballage de polypropylène hermétique permet également de limiter les échanges gazeux et ainsi de diminuer le BI (Wilson Witjeratnam *et al.*, 1993).

Néanmoins ce procédé, pourrait induire une réponse du système respiratoire anaérobie induisant la production de sous-produits qui pourraient expliquer la perte de qualités organoleptiques des fruits traités (Wilson Witjeratnam *et al.*, 1993).

2.5.3 L'amélioration variétale

La création de nouvelles variétés d'ananas résistantes au BI par croisement variétal est un processus long et coûteux. Jusqu'à présent seulement 2 variétés d'ananas résistantes au BI ont été obtenues: la variété MD2 de la firme Del Monte et un hybride hawaïen appelé Hawaiian gold (55-116) (Stewart *et al.*, 2002). La création de ces nouvelles variétés est très complexe puisqu'elles doivent à la fois résister au BI, posséder de bonnes qualités organoleptiques et résister aux maladies.

Au niveau biotechnologique, l'inhibition de l'expression du gène codant la PPO pourrait aboutir par transgénèse à l'obtention de plants résistants au BI. La transgénèse par biolistique sur des cals d'ananas a donné des résultats encourageants (Graham *et al.*, 2000; Ko *et al.*, 2006).

3 La contrainte au froid

3.1 Les conditions

Les effets du « stress au froid » (cold stress) sur les plantes diffèrent en fonction de son intensité (Ruelland *et al.*, 2009). Le froid par congélation « freezing stress » correspond à des températures inférieures à 0°C. Tandis que le « chilling stress » froid dit de refroidissement, correspond aux températures basses mais supérieures à 0°C (Figure 17). La littérature abonde sur le stress au froid, il est important de souligner que la réponse des plantes au froid, impliquant une régulation du métabolisme, et une synthèse de macromolécules nécessaires à l'adaptation se produit à des températures comprises entre 0°C et 10°C.

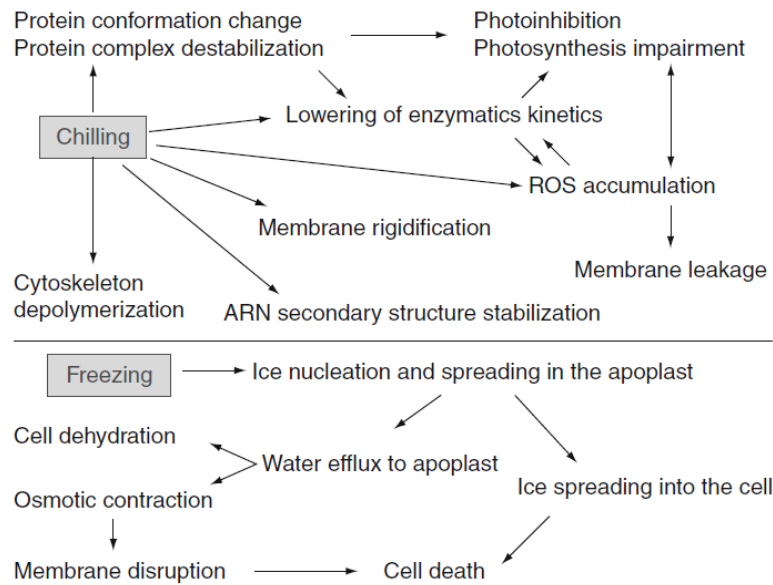


Figure 17 : les 2 types de stress au froid dans une cellule de plantes (Ruelland *et al.*, 2009)

3.2 La contrainte au froid : « chilling stress »

3.2.1 Généralités

Nous nous focaliserons au cours de cette synthèse sur le phénomène de « chilling stress », terme utilisé à la fois dans le cas des plantes des régions tempérées et des plantes tropicales et subtropicales soumises à des températures non gélives mais également dans le cas des fruits soumis à de basses températures lors de la conservation en post-récolte (Sevillano *et al.*, 2009).

La contrainte au froid est une des contraintes abiotique parmi les plus importantes car elle génère des pertes économiques considérables et constitue un facteur limitant de la production de plantes d'importance agronomiques comme le soja, le riz, le maïs (Heidarvand et Maali Amiri. 2010) ou encore pour la production et l'exportation de fruits tropicaux comme la banane, la mangue, les agrumes et l'ananas (Laville. 1994). En effet les fruits tropicaux sont fragiles et très périssables qui, dès leur récolte doivent être manipulés avec précaution et consommés rapidement. Les fruits peuvent être endommagés par des blessures, d'où l'entrée de pathogènes. De plus dès la récolte la sénescence s'installe et les fruits perdent

progressivement leurs qualités nutritionnelles et organoleptiques. Ces phénomènes sont accrus dans le cas des fruits non-climactériques comme l'ananas récolté à maturité. Ainsi des techniques de conservation des fruits pour l'exportation par bateau sont mises en place par les acteurs des filières agronomiques. Le traitement le plus répandu est la mise au froid des fruits en vue de ralentir leur sénescence et de réduire le développement de pathogènes (Laville, 1994).

3.2.2 La stratégie adaptative au froid

Le froid : de la perception du stimulus à la régulation des gènes

Les plantes soumises aux contraintes abiotiques comme l'excès de sel dans le sol, le déficit hydrique ou le froid induisent des réponses similaires (Figure 18) impliquant: la perception des stimuli, la transduction des signaux, leur amplification et enfin l'activation de l'expression de gènes répondant à ces contraintes via des facteurs de transcriptions (Wang *et al.*, 2003). Les plantes soumises au froid présentent une stratégie adaptative permettant de percevoir les stimuli et d'activer des réponses pour augmenter leur résistance vis-à-vis de contraintes environnementales (Nuoti *et al.*, 2001). Cette stratégie est très étudiée dans le cas du froid à des températures en dessous de 0°C avec une phase d'acclimatation des plantes exposées à de basses températures. Cependant elle est très peu connue dans le cas du froid à des températures non gélives, bien qu'elle puisse présenter des voies de signalisations communes (Saijo *et al.*, 2000 ; Gong *et al.*, 2002 ; Dong *et al.*, 2006 ; Hsieh *et al.*, 2002 ; Sevillano *et al.*, 2009 ; Ruelland *et al.*, 2009).

La perception

Les récepteurs ou senseurs perçoivent les stimuli et relaient les signaux physiques ou chimiques. Les récepteurs du froid sont mal connus (Heidarvand et Maali Amiri, 2010). Pourtant il semble que ceux-ci puissent détecter un changement de fluidité des membranes, de conformation des complexes macromoléculaires, de concentration de métabolites et pourraient également être couplés à un réarrangement du cytosquelette (Nuotio *et al.*, 2001 ; Viswanathan et Zhu, 2002 ; Chinnusamy *et al.*, 2007). Il semblerait que lors d'un stress au froid, des histidines kinases comme atHK1 étudié chez *Arabidopsis thaliana*, les RLKs

récepteur like kinase comme RPK1 ou encore les canaux à calcium puissent être des récepteurs potentiels (Ding et Pickard. 1993 ; Solanke et Sharma. 2008).

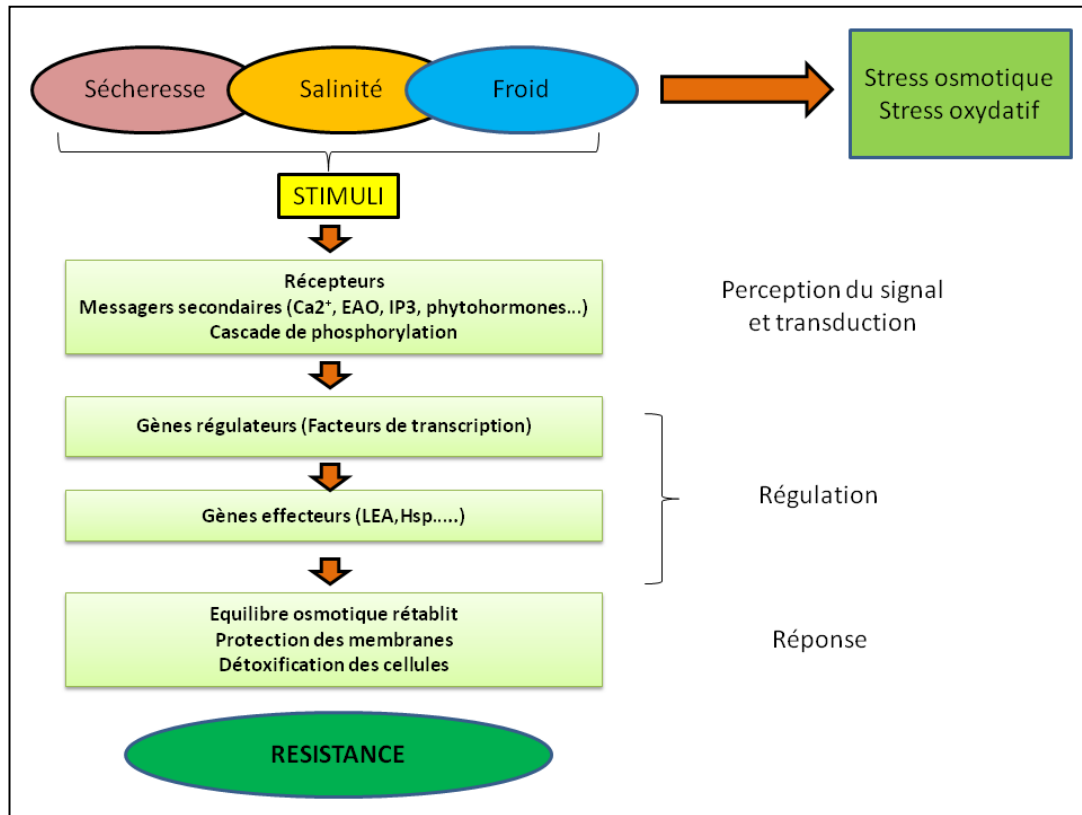


Figure 18 : Stratégie adaptative des plantes aux stress abiotiques (d'après Wang *et al.*, 2003)

La signalisation

La transduction des signaux se réalise via des messagers secondaires comme le calcium, les espèces actives d'oxygène (EAO), l'inositol 1,4,5 triphosphate IP3 et les phytohormones (acide abscissique, éthylène...) qui induisent une cascade de phosphorylation des protéines via des récepteurs comme : « receptor like protein kinase » et « G-protein associated kinase » qui peuvent être couplés au calcium comme la « calcium dependant protein kinases » CDPKs, « mitogen activated protein » MAPKs et des protéines phosphatases (Nuoti *et al.*, 2001 ; Ruelland *et al.*, 2009).

Le calcium cytoplasmique joue un rôle important dans les processus cellulaires. Il est fréquemment impliqué en tant que messenger secondaire chez les plantes en réponse aux stimuli externes (Nuotio *et al.*, 2001 ; Lukatkin *et al.*, 2005 ; Sano *et al.*, 2006). Des études ont montré une augmentation de celui-ci en réponse au froid (Jian *et al.*, 1999 ; Holdaway-Clarke *et al.*, 2000). De plus une baisse de température de l'ordre de 6 à 7°C tend à activer les

canaux à calcium, déclenchant alors un influx de calcium vers le cytosol (Ding et Pickard. 1993). Des études ont également montré que le calcium était nécessaire à l'induction de gènes répondant au froid comme les CDPKs « calmodulin dependant protein kinase » (Saijo *et al.*, 2001 ; Wan *et al.*, 2007).

L'acide abscissique ABA, peut jouer un rôle très important dans la transduction des signaux en réponse aux stress. Il existe 2 grandes voies appelées voies : dépendante à l'ABA et indépendante à l'ABA. Dans le cas de la réponse aux basses températures, l'analyse des promoteurs et l'expression de gènes inductibles montrent une implication de l'ABA (Sevillano *et al.*, 2009). En réponse au froid une augmentation de la teneur en ABA est corrélée à la résistance des plantes (Janowiak *et al.*, 2002). Des applications externes d'ABA induisent une baisse des efflux d'électrolytes cellulaires (Sevillano *et al.*, 2009).

D'autres phytohormones comme l'acide salicylique SA, l'acide jasmonique JA, leur méthylesther MeSA, MeJA ainsi que l'éthylène joueraient un rôle dans la signalisation de la réponse au froid (Fung *et al.*, 2004).

Facteurs de transcription et régulation des gènes répondant à la contrainte

Les gènes répondant aux basses températures peuvent être régulés au moment de la transcription via des facteurs de transcription (FT), après la transcription au niveau des pre-mRNA, de la stabilité des mRNA, des étapes d'exportation du noyau (Zhu *et al.*, 2007), mais également après la traduction (Chinnusamy *et al.*, 2007).

Les gènes de la superfamille COR « cold-regulated », appelés encore LTI « Low temperature induced », sont impliqués dans résistance des plantes aux basses températures (Thomashow. 1990). Ils sont régulés via des séquences *cis* régulatrices CRT(C-repeat) ou DRE « Dehydration responsive–element ». Ces éléments comprennent 5 nucléotides hautement conservés (CCGAC) situés au niveau du promoteur de nombreux gènes répondant au froid et à la déshydratation dont ceux de la superfamille COR. (Thomashow. 1999). Le froid induit l'expression de facteurs de transcription CBFs « C-repeat binding factors » ou DREBs « Dehydration Response Element Binding » qui se lient aux éléments *cis* des promoteurs des gènes régulés par le froid et activent leur expression. Ces facteurs de transcription appartiennent à la superfamille des DNA-binding protein connus sous le nom d'AP2/EREBP (Sevillano *et al.*, 2009).

Ces facteurs de transcription régulent l'expression de gènes impliqués dans la composition des lipides membranaires, de la biosynthèse d'osmolytes (proline, sucres solubles...), de

détoxification des espèces actives d'oxygènes EAO, du métabolisme hormonal, de protéases et également ceux connus pour avoir un rôle de protection des cellules comme les LEA (Late Embryogenesis Abundant proteins), les Hsp (Heat Shock protein) (Sevillano *et al.* 2009). Les produits des gènes activés, peuvent être des molécules régulatrices (phytohormones) comme l'ABA, l'éthylène, l'acide salicylique qui a leur tour initient une seconde voie de signalisation impliquant d'autres gènes (Xiong *et al.*, 2002).

3.2.3 Les réponses cellulaires et moléculaires associées au « chilling stress »

Les basses températures modifient le métabolisme et plus précisément initient ou accélèrent les processus de dégradation (Raison et Glenda. 1990). Le froid diminue la vitesse des réactions enzymatiques, perturbe le métabolisme respiratoire, modifie la structure et la composition des membranes et altère ses propriétés. Le froid influe également sur la production de molécules toxiques, la quantité de molécules et enzymes antioxydantes ainsi que sur l'expression de gènes et de protéines spécifiques. Ces événements ont des conséquences importantes sur les processus biologiques, l'équilibre physiologique des cellules et leur intégrité (Ruelland *et al.*, 2009 ; Sevillano *et al.*, 2009).

a) Modification des membranes

Dès 1964-65 Lyons *et col.* ont émis l'hypothèse que le froid affecte en premier les propriétés physiques et physiologiques des membranes mitochondriales et lipidiques. En 1973, Lyons et Raison proposent « la théorie des membranes » comme réponse primaire initiée par le stress au froid. Les constituants lipidiques des membranes subissent un changement thermotropique avec un passage d'une phase liquide cristalline à une phase solide gélifiée (Figure 19). Cette structure particulière rigidifie les membranes et perturbe la conformation des protéines structurales insérées dans la bicouche ou des enzymes régulatrices proches de celles-ci. Ce changement de conformation tend à désactiver les enzymes, ou à ralentir leur activité. De plus la surface des membranes présenterait des lipides plus rapprochés ce qui pourrait changer le champ de charges à l'intérieur des membranes et forcerait les ions à passer au travers pour maintenir un certains équilibre (Wolf. 1978).

A ces changements de conformation et de structure des membranes cellulaires est associé une modification de la composition lipidique des membranes (Figure 20) (Marangoni *et al.*, 1996 ; Sevillano *et al.*, 2009). Le froid induit des changements dans le rapport acides gras saturés/insaturés (augmentation de l'index de saturation des acides gras) et stérol/phospholipides ont été observés. Une proportion élevée de phospholipides particuliers comme la N-acylphosphatidylethanolamine semble être impliquée dans la résistance de pêches soumises au froid (Zhang *et al.*, 2010). Généralement les plantes sensibles au froid contiennent plus de phosphatidylglycérol saturé (PG) de type 16 :0/16 :0 et 16 :0/16 :1t que les plantes résistantes au froid (Murata et Nishida. 1990). De plus les plantes résistantes ont généralement des chaînes lipidiques plus courtes et une proportion d'acides gras insaturés plus élevés ce qui contribue à augmenter la fluidité membranaire (Wolf. 1978 ; Makarenko *et al.*, 2002 ; Zhang *et al.*, 2010). Enfin l'activité de la fatty acid desaturase (FAD, EC 1.14.19.1-3) qui contrôle l'insaturation des lipides est stimulée en réponse au froid (Upchurch. 2008).

Les changements de structure et de composition des membranes influent sur la perméabilité membranaire, en augmentant la viscosité des membranes, en modifiant l'équilibre des charges. Il en résulte une augmentation de la perméabilité membranaire aux électrolytes et qui contribue à la perte de compartimentation des cellules (Sevillano *et al.*, 2009). Ces modifications se feraient de façon hétérogène et seul 2-5 % des lipides membranaires seraient concernés dans les chloroplastes et les mitochondries (Marangoni *et al.*, 1996). Dans le cas d'un froid en post-récolte avec une phase de réchauffement, cette phase de séparation latérale des lipides membranaires a pu être détectée (Sharom *et al.*, 1994).

b) Altération de la structure du cytosquelette

En réponse aux températures basses l'organisation du cytosquelette (microfilaments d'actine, et microtubules) est modifiée (Drobak *et al.*, 2004). Il se produit une dépolymérisation des microtubules et des microfilaments (Ruelland et Zachowski. 2010), qui serait modulée par la concentration en calcium cytoplasmique (Raison et Glenda. 1990). En effet le réarrangement des filaments d'actine induit une diminution de la fluidité membranaire et déclenche l'ouverture de canaux calcique augmentant alors l'influx de calcium (Drobak *et al.*, 2004)

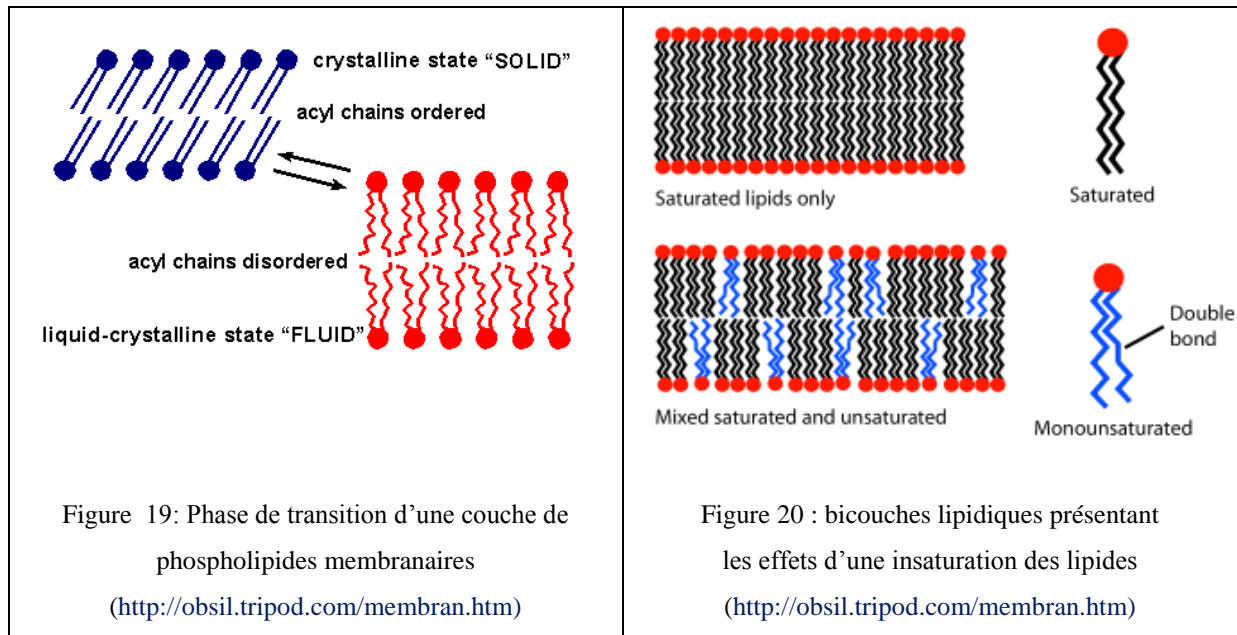


Figure 19: Phase de transition d'une couche de phospholipides membranaires
(<http://obsil.tripod.com/membran.htm>)

Figure 20 : bicouches lipidiques présentant les effets d'une insaturation des lipides
(<http://obsil.tripod.com/membran.htm>)

c) Les phénomènes dégradatifs impliqués dans la balance anabolique/catabolique

Production d'EAO et perturbation du système antioxydant

Des études rapportent que le traitement de plantes ou de tissus soumis au froid avec retour à température ambiante, déclenche un stress oxydatif (Prasad. 1996 ; Imahori *et al.*, 2008), d'où une accumulation des espèces actives de l'oxygène comme $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , HO_2^{\cdot} , RO^{\cdot} , H_2O_2 et O_2 . Une forte concentration en EAO induit la peroxydation des lipides membranaires (Ferrari-Iliou *et al.*, 1994), l'oxydation des protéines, l'inhibition des activités enzymatiques et des dommages à l'ADN et l'ARN (Sevillano *et al.*, 2009 ; Gill et Tuteja. 2010 ; Miller *et al.*, 2010). En parallèle une perturbation du système antioxydatif mettant en jeu des enzymes antioxydantes comme la catalase CAT, l'ascorbate peroxidase APX, la superoxyde dismutase SOD et GR glutathione réductase a été observée (Imahori *et al.*, 2008).

Action des enzymes lipolytiques

Le froid peut induire une dégradation des lipides comme les phospholipides et les galactolipides notamment MGDG (monogalactosyl-diacylglycerol) (Pham Thi *et al.*, 1989 ; Parkin et Kuo. 1989 ; Pinhero *et al.*, 1998). Il semblerait que l'activité des galactolipases soit en relation avec la sensibilité des plantes au « chilling stress », (Gemel et Kaniuga. 1987 ; Kaniuga. 2008). De plus une augmentation des activités des enzymes lipolytiques comme la phospholipase D (PLD EC 3.1.4.4) et la lipoxygénase (LOX EC 1.13.11.12) a été observée en réponse à la contrainte hydrique (Sahsah *et al.*, 1998 ; El Maarouf *et al.*, 1999 ; Matos *et al.*,

2001) et au froid en post-récolte chez les fruits comme les concombres et les litchis (Mao *et al.*, 2007 ; Liu *et al.*, 2011). Les phospholipases sont les premières enzymes impliquées dans le turnover des lipides. Ils interviennent dans la signalisation cellulaire en réponse aux contraintes comme le froid (Ruelland *et al.*, 2009). Une action incontrôlée des phospholipases ainsi qu'une perturbation de la biosynthèse des phospholipides au froid (Pinhero *et al.*, 1998 ; Campos *et al.*, 2003) peuvent entraîner une perte de l'équilibre homéostatique des lipides membranaire et contribuer à la dégradation des membranes. Une peroxydation des lipides est stimulée dans le cas de contraintes aux basses températures (Parkin et Kuo. 1989 ; Imahori *et al.*, 2008). Ce phénomène contribue à diminuer la proportion des glycolipides insaturés des membranes (oxydés par la lipoxygénase LOX) et donc à la rigidification et dégradation des membranes (Gill and Tuteja. 2010).

Mise en place de moyens de protections des structures cellulaires

Les protéines chaperonnes « heat shock protein » Hsp sont des protéines intracellulaires qui contrôlent la conformation, le repliement, l'assemblage oligomérique des protéines, le transport à travers la membrane. L'expression de gènes qui les codent est stimulée en réponse aux températures basses (Sabehat *et al.*, 1998).

Les protéines LEA « Late Embryogenesis Abundant », il s'agit de protéines très hydrophiles et thermostables qui contiennent des motifs répétés en acides aminés capables de former des hélices α amphipathiques qui interviendraient dans la stabilisation des enzymes en réponses aux températures basses (Thomashow *et al.*, 1999).

Les polyamines Pas, comme la tetramine spermidine (Spm), triamine spermidine (Spd) et la diamine putrescine (put) sont ubiquitaires chez les plantes et constituent des agents « « anti sénescence » » (Sevillano *et al.*, 2009). Elles possèdent 2 rôles importants comme la stabilisation membranaire des phospholipides membranaires en se liant aux charges négatives de ceux-ci. Elles pourraient alors contribuer à ralentir leur altération. Elles possèdent également des propriétés antioxydantes en protégeant les membranes de la peroxydation des lipides induites par les EAO. De plus leur synthèse fait intervenir de la S adenosylmethionine, un précurseur de la biosynthèse de l'éthylène. Une augmentation de la teneur en polyamines a été trouvée chez la tomate, en réponse au froid avec pour effet concomitant une réduction des efflux d'électrolytes (Kim *et al.*, 2004). Enfin des plantes transgéniques d'*Arabidopsis thaliana* sur-exprimant un gène codant une polyamine se sont avérées tolérantes au froid (Kasukabe *et al.*, 2004).

4 La protéolyse chez les plantes

4.1 Les protéases des organites

4.1.1 Les fonctions protéolytiques

La dégradation des protéines est un processus complexe impliquant de nombreuses voies de signalisation des protéases au niveau du cytoplasme, du noyau et des organites cellulaires (Vierstra. 1996).

Les protéases interviennent dans la régulation des processus biologiques liés au développement, à la croissance des plantes, et à la sénescence. Elles sont également impliquées dans les processus de défense des plantes en réponse aux contraintes biotiques (ravageurs de cultures, pathogènes) ou abiotiques comme la sécheresse (Roy-Macauley *et al.*, 1992 ; Dramé *et al.*, 2007 ; Simova-Stoilova *et al.*, 2009 et 2010), la salinité, la pollution aux métaux lourds (Brunet *et al.*, 2009) ou encore les variations de températures (Grudkowska et Zagdanska. 2004 ; Schaller. 2004 ; Van der Hoorn et Jones. 2004 ; Van der Hoorn. 2008).

Les protéases sont impliquées dans le maintien de la qualité des protéines et de leur renouvellement. Les protéines anormales (non fonctionnelles) et indésirables sont spécifiquement dégradées ainsi que les protéines de réserves dans le protéasome (Araujo *et al.*, 2011). Les acides aminés composant les protéines cellulaires dégradées sont remobilisées et recyclées pour synthétiser de nouvelles protéines. Les protéases jouent également un rôle important de régulateurs des processus cellulaires. En effet elles sont impliquées dans l'un des nombreux processus de modification post-traductionnelle des protéines par des protéolyses sélectives au niveau de sites spécifiques conduisant à la maturation des zymogènes et au contrôle de l'activité des enzymes (Schaller. 2004).

4.1.2 Mode d'action des protéases, classification et nomenclature

Les protéases polarisent le groupement carbonyle du substrat en stabilisant leur oxygène dans une poche appelée « oxyanion hole », ce qui rend l'atome de carbone plus vulnérable aux attaques de nucléophiles et permet l'hydrolyse du substrat (Figure 21).

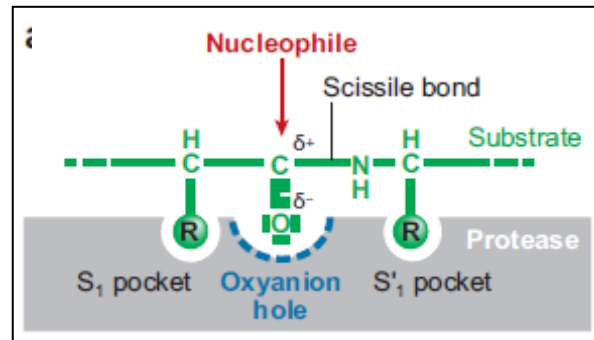


Figure 21 : Mécanisme général de l'hydrolyse des protéines par les protéases (Van der Hoorn. 2008)

Les protéases sont classées selon 3 critères majeurs basés sur le type de réactions catalysées, la nature chimique du groupement situé dans leur site catalytique (acides aminés ou élément métallique), et classées en clan et familles selon leurs relations d'évolutions (Rawlings et Barrett. 1994; Barrett. 1994 ; Rawlings *et al.*, 2010, <http://merops.sanger.ac.uk/>).

Deux types de réactions sont catalysées par les protéases et permettent de distinguer les exoprotéases (EC.3.1.1.1-19) et les endoprotéases (EC.3.4.21-99). Les exoprotéases hydrolysent les protéines (substrat) au niveau de leurs extrémités. Elles peuvent être de deux types : les carboxypeptidases et les aminopeptidases. Les carboxypeptidase interviennent au niveau de l'extrémité C terminale de la protéine tandis que les aminopeptidase agissent sur l'extrémité N terminale. Les endoprotéases ou protéinases (Barrett et Mc Donald. 1986) sont couramment des protéases intracellulaires non excrétées. Elles hydrolysent les liaisons peptidiques à l'intérieur de la chaîne polypeptidique des protéines. Actuellement, 5 classes d'endoprotéases sont connus chez les plantes : les protéases à cystéine CP (EC 3.4.22), les protéases à sérine SP (EC 3.4.21), les métalloprotéases MP (EC 3.2.24), les protéases à acide aspartique AP (EC 3.4.23) et les protéases à thréonine TP (EC 3.4.25) (Van der Hoorn. 2008 ; Rawlings *et al.*, 2010). Leurs proportions au sein des plantes sont variables selon les systèmes. Chez *Arabidopsis Thaliana* environ 826 protéases ont été identifiées, dont la majorité correspondent aux protéases à sérine (Schaller. 2004 ; Van der Hoorn. 2008). Tandis que chez *Populus trichocarpa* se sont les protéases à acide aspartique qui sont majoritairement présentes (Garcia-Lorenzo *et al.*, 2006).

4.2 Les protéases à cystéine

4.2.1 Classification des protéases à cystéine

Les protéases à cystéine encore appelées thiol protéases ont été trouvées chez les virus, les bactéries, les protozoaires, les procaryotes, les plantes et les animaux (Otto et Schirmeister. 1997 ; Wiederanders. 2003). Le génome des plantes comprend environ 140 protéases à cystéine appartenant à 15 familles et 5 clans (Van der Hoorn. 2008 ; Rawlings *et al.*, 2010, [http: //merops.sanger.ac.uk](http://merops.sanger.ac.uk)).

4.2.2 Un exemple de protéase à cystéine : la papaïne

La papaïne fut découverte la première fois dans le latex des fruits de *Carica papaya*. Elle est souvent utilisée comme modèle pour l'étude des protéases à cystéine. Il s'agit de la cystéine protéase la plus représentée chez les plantes avec plus de 50 homologues de la papaïne trouvés dans 26 espèces différentes (Beers *et al.*, 2000 et 2004). Elle appartient aux protéases du clan CA et à la famille C1 (Rawlings *et al.*, 2010, [http: //merops.sanger.ac.uk](http://merops.sanger.ac.uk)). Les protéases ayant une forte homologie avec la papaïne sont nommées « papaïne-like ».

Structure de la protéine et mécanisme d'action du site actif

La papaïne possède une structure tertiaire avec 2 domaines L (left) et R (right), et présente 3 résidus d'acides aminés importants : Cystéine (C25), Histidine (H 159) et Asparagine (N175) (Figure 22). La protéine est synthétisée sous forme immature (preproprotéine). Elle se compose de 3 parties : N terminal, peptide signal (10-20 aa) ; prosequence (38-250 aa) et la partie correspondant à l'enzyme mature (220-260 aa). La maturation de la protéine correspond au retrait des parties pre et pro de la protéine (Turk *et al.*, 1997).

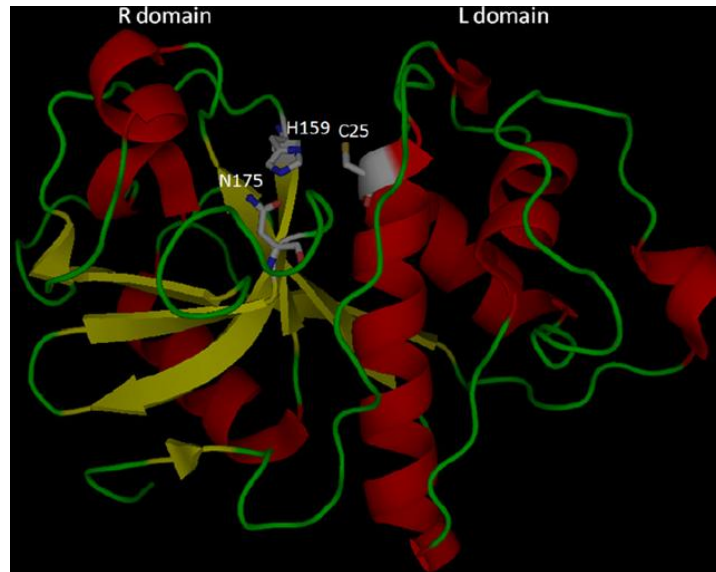


Figure 22 : Structure tridimensionnelle de la papaïne et son site actif (Pickersgill *et al.*, 1992)

Le site catalytique des protéases à cystéines contient 2 acides aminés catalytiques : cystéine et histidine et une asparagine qui intervient dans l'orientation de l'histidine (Beers *et al.*, 2004). L'histidine, adjacente au résidu cystéine dé-protone l'atome de soufre du résidu cystéine. Une attaque nucléophile de ce soufre dé-protoné est réalisée sur le carbone du substrat (polarisé au préalable). Une partie du substrat est alors libérée, tandis que l'autre partie est liée à la cystéine du site actif, formant un thioester intermédiaire instable. Puis la liaison est hydrolysée libérant le reste de substrat et le résidu cystéine est restauré (Figure 23).

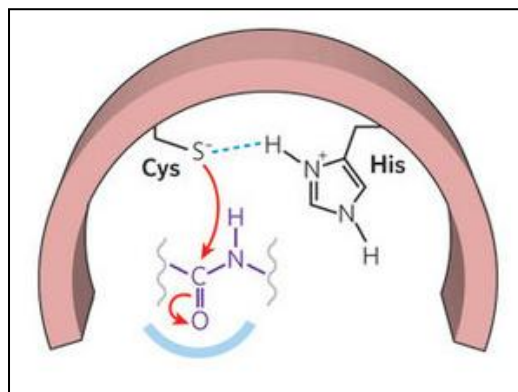


Figure 23 : Réaction catalytique réalisée par le site actif d'une protéase à cystéine (d'après Neitzel, 2010)

4.2.3 Le rôle des protéases à cystéine

Les protéases à cystéine CP jouent un rôle important dans une multitude d'événements comme la régulation de la floraison, l'architecture des inflorescences et le développement embryonnaire (Van der Hoorn, 2008). Elles sont également impliquées dans la dégradation des protéines de réserves et la remobilisation de l'azote pendant la germination des graines via

des « vacuolar processing enzyme » VPE appartenant aux groupe des légumains (Muntz *et al.*, 2002 ; Shimada *et al.*, 2003 ; Oliveira *et al.*, 2003) et lors de la sénescence des feuilles (Chen *et al.*, 2002 et 2010 ; Esteban-Garcia *et al.*, 2010 ; Maciel *et al.*, 2011). Les CP sont également impliquées dans la mort cellulaire programmée MCP via des caspases (C14), des calpaines calcium dépendantes (C2) ou encore via des enzymes appelées métacaspases (Solomon *et al.*, 1999 ; Beers *et al.*, 2000 ; Baek et Choi. 2008).

Des travaux relativement récents ont montré que les CP sont impliquées dans la réponse aux contraintes environnementales. Les résultats obtenus ont d'abord concerné les contraintes biotiques. Les CP sont connues pour contribuer à la résistance des plantes face aux pathogènes (Kruger *et al.*, 2002 ; Rooney *et al.*, 2005) et aux insectes (Shindo et Van der Hoorn. 2008). En ce qui concerne les contraintes abiotiques, l'expression des gènes codant les CP et leur activités enzymatique sont stimulées en réponse à la sécheresse (Forsthoefel *et al.*, 1998), au sel (Forsthoefel *et al.*, 1998 ; Khanna-Chopra *et al.*, 1999 ; Dramé *et al.*, 2007 ; Simova-stoilova *et al.*, 2006 et 2009 ; Chen *et al.*, 2010) aux métaux lourds (Brunet *et al.*, 2009) ou au froid (Schaffer et Fischer. 1990 ; Prasad. 1996 ; Stroehrer *et al.*, 1997).

4.3 Les protéases à acide aspartiques

4.3.1 Classification

Les protéases à acide aspartiques AP (EC 3.4.23), sont ubiquitaires. Elles sont présentes chez les virus (HIV), les bactéries (protéases A, Simoes et Faro. 2004), les champignons (les penicillopepsines), les animaux (pepsine, renine, cathepsines D) (Figure 24), et les plantes. Il existe 14 familles d'AP classées selon leur homologie de séquences en acides aminés. Ces familles sont assemblées en 6 clans basés sur l'évolution et leur structure tertiaire. Chez les plantes les familles A1, A3, A11, A12 (clan AA), A22 (clan AD) sont représentées (Beers *et al.*, 2004 ; Van der Hoorn. 2008). La famille A1 contient 5 sous familles, la phytepsine étant la plus étudiée (Beer *et al.*, 2004 ; Chen *et al.*, 2002). L'étude du génome d'*Arabidopsis* a révélé l'existence d'autres AP classées selon l'organisation de leurs domaines, et les séquences de leur site actif (Faro et Gal. 2005).

Les AP sont inhibées spécifiquement par la pepstatine A et ont une activité catalytique optimale à pH acide (Simoes et Faro. 2004). Les AP hydrolysent préférentiellement les liaisons peptidiques entre les résidus hydrophobes des acides aminés (Davies. 1990)

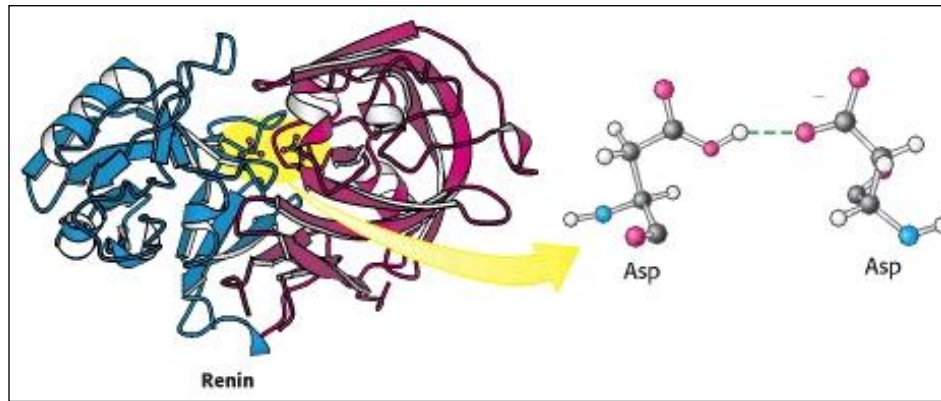


Figure 24 : Protéase à acide aspartique (rénine) en trois dimensions et son site catalytique (Berg *et al.*, 2002)

Les protéases à acide aspartique AP sont synthétisées sous forme d'un précurseur inactif qui comprend une pre et une proséquence situées au niveau du N-terminal de la protéine (Davies. 1990 ; Mutlu et Gal. 1999), une partie comportant 2 résidus à aspartate constituant le site actif présentant les motifs conservés Asp-Thr/Ser-Gly et une partie appelée « plant specific insert » PSI d'environ 100 aa, située au niveau C-terminal de la protéine qui comporte des éléments ayant une forte homologie avec des saposines de mammifères (Runeberg-Roos *et al.*, 1991 ; Simoes et Faro. 2004). La proséquence possède un rôle particulier dans le repliement de la protéine et dans la régulation du mécanisme d'activation de l'enzyme, puisqu'il bloque l'entrée du site actif de celle-ci (Yada et Tanaka. 2004). De plus le PSI semble être impliqué dans la spécificité au substrat, la perméabilité membranaire, la localisation, l'exportation de la protéine ou encore dans la réponse aux contraintes biotiques (Beers *et al.*, 2004 ; Schaller. 2004). La maturation de la protéine nécessite l'excision de la proséquence et celle (facultative) du PSI (Simones et Faro. 2004).

4.3.2 Site actif et mode d'action

Le site actif des protéases à acide aspartiques comprend 2 résidus aspartate qui activent une molécule d'eau structurale (eau lytique). Celle-ci, via le groupement carbonyle du substrat forme un intermédiaire tétraédrique instable. Puis un réarrangement des charges se produit réalisant la coupure de la liaison amide et le résidu aspartate est restauré dans sa forme initiale (Figure 25).

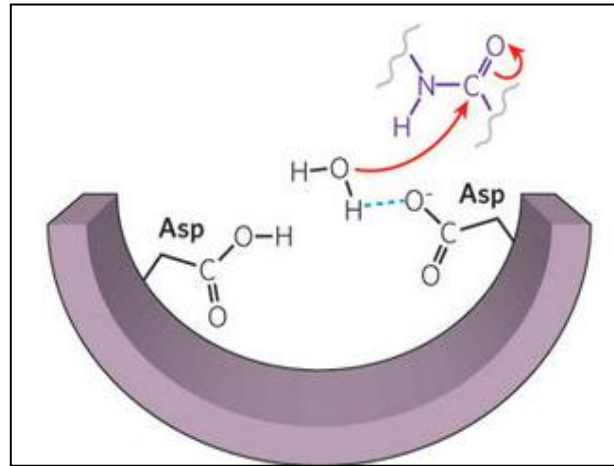


Figure 25 : Réaction catalytique au site actif AP (Neitzel. 2010)

4.3.3 Les fonctions des protéases à acide aspartiques

Les fonctions biologiques des AP sont encore mal connues (Mutlu *et al.*, 1999; Timotijevic *et al.*, 2010). Néanmoins, elles sont impliquées dans divers processus protéolytiques comme la maturation et/ou la dégradation de protéines et de précurseurs de protéines (Davies. 1990 ; D'Hont *et al.*, 1993 ; Mutlu et Gal. 1999). Elles interviennent dans la reproduction, la reconnaissance du pollen (Faro *et al.*, 1999), la germination incluant la maturation et l'hydrolyse des protéines de stockage (Runeberg-Roos *et al.*, 1994 ; Guilloteau *et al.*, 2005) et le développement (D'Hondt *et al.*, 1997 ; Runeberg-Roos *et al.*, 1991). Elles interviennent également lors de la sénescence des feuilles (Cruz de Carvalho *et al.*, 2004), des fleurs (Buchanan-Wollaston, 1997 ; Panavas, *et al.*, 1999), la formation des faisceaux vasculaires et la mort cellulaire programmée (Runeberg-Roos et Saarma. 1998; Terauchi *et al.*, 2004).

Les AP sont impliquées dans la réponse des plantes aux contraintes biotiques (pathogènes ou ravageurs de cultures). Des AP digestives ont été trouvées chez les plantes carnivores *Nepenthes* (Schaller. 2004). De plus une AP CDR1 de l'apoplaste serait impliquée dans la résistance des plantes à *Pseudomonas syringae* (Simoes *et al.*, 2007). Son rôle résiderait dans sa capacité à réguler la production d'un peptide endogène impliqué dans l'activation de mécanismes de résistance (Xia *et al.*, 2004).

Les AP sont également impliquées dans les réponses aux les contraintes abiotiques de l'environnement comme la sécheresse (Cruz de Carvalho *et al.*, 2001 ; Contour Ansel *et al.*, 2010), les métaux lourds (Pena. 2006 ; Brunet *et al.*, 2009), l'absence de lumière (Chen *et al.*, 2009), l'exposition aux UV-B (Timotijevic *et al.*, 2010), les blessures (Schaller et Ryan,

1996 ; Guevara *et al.*, 2002). Elles répondent également à l'acide salicylique (Timotijevic *et al.*, 2010). De manière très générale l'expression du (des) gène(s) codant la(les) protéases à acide aspartique et l'activité de l'enzyme sont stimulées en réponse à ces contraintes. De plus il semble que les AP puissent jouer un rôle dans la sensibilité ou la résistance des plantes en réponse à la sécheresse. En effet l'expression du gène codant pour une aspartique protéase s'exprime de façon différentielle selon les variétés, avec une accumulation des transcrits plus importantes chez les variétés sensibles (Cruz de Carvalho *et al.*, 2001 ; Contour Ansel *et al.*, 2010).

4.4 Régulation et inhibition des endoprotéases

Les endoprotéases présentent une forte spécificité pour leur substrat. Elles sont régulées dans le temps et dans l'espace (Schaller. 2004), étant compartimentées afin de ne pas être en contact direct avec leur substrat (vésicules lytiques). Leur activité est régulée via l'activation du zymogène par hydrolyse de la proséquence qui présente un fort potentiel d'inhibition (Wiederanders. 2003). Enfin les endoprotéases sont inhibées par des inhibiteurs naturels comme la cystatine pour les protéases à cystéine. L'ensemble de ces processus permet de réguler finement l'activité de ces enzymes et de limiter leurs effets qui peuvent être délétères pour les cellules, de par la sur-expression de leurs gènes et de l'augmentation de leur activité (Habib et Khalid. 2007).

4.4.1 Les inhibiteurs de protéases

Environ 12 familles d'inhibiteurs sont connues chez les plantes. Les inhibiteurs sont classés en fonction de leur séquence en acides aminés et de la protéase qu'ils inhibent. Chez 129 plantes différentes, 495 inhibiteurs de protéases ont été identifiés. Ces inhibiteurs sont localisés en général au niveau des organes de réserve, dans les graines, les tubercules afin de préserver une réserve de protéines qui sera remobilisée pendant la germination. Ils peuvent également être localisés dans les parties aériennes des plantes en réponse à divers stimuli.

Ces inhibiteurs forment des complexes stables avec leur cible protéasique en bloquant, en altérant, ou en évitant l'accès au site actif des enzymes. Ils régulent la protéolyse cellulaire en inhibant les protéases endogènes et par conséquent, contrôlent le métabolisme catabolique des

plantes. Ils jouent également un rôle dans la défense des plantes vis-à-vis des pathogènes et des ravageurs.

4.4.2 La cystatine

L'activité inhibitrice des cystatines est vitale pour la régulation des processus physiologiques en limitant la potentialité des activités hydrolytiques des protéases à cystéine endogènes et exogènes comme les papaines (C1A). La cystatine est un inhibiteur réversible naturel présent chez les animaux et les plantes (Benchabane *et al.*, 2010). Les cystatines sont classées en 3 types : les stéfines, les cystatines, les kininogènes (Turk *et al.*, 2008). Les cystatines de plantes font majoritairement partie des phytocystatines PhyCys (Oliveira *et al.*, 2003).

a) Mode d'action et structure

Les phytocystatines sont caractérisées par la présence d'une zone consensus [LVI]-[AGT]-[RKE]-[FY]-[AS]-[VI]-X-[EDQV]-[HYFQ]-N située dans l'hélice α près de la région N-terminale de la protéine (Margis *et al.*, 1998). La cystatine possède une structure tertiaire formée de 5 feuillets β entourée par deux hélices α (Figure 26). Elle forme un complexe équimolaire réversible avec les protéases à cystéines en prenant la place du substrat (blocking inhibitor). Trois motifs très conservés sont impliqués : le site actif QxVxG situé dans la région centrale de la chaîne polypeptidique (boucle), le motif P-W ou L-W situé dans la région C terminale (boucle) et un ou deux résidus Glycine dans la région N-terminale, laquelle n'interagit pas directement avec le site actif mais semble nécessaire à l'activité de l'inhibiteur (Margis *et al.*, 1998 ; Shyu *et al.*, 2004 ; Benchabane *et al.*, 2010).

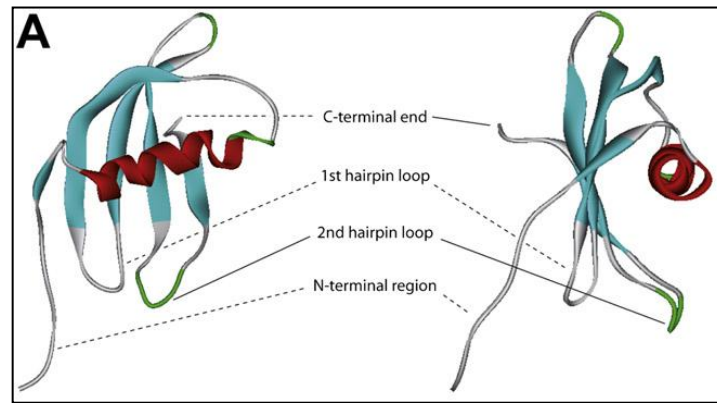


Figure 26 : Structure d'une oryza cystatine (Benchabane *et al.*, 2010).

Les 5 feuillets β sont colorés en bleu ; l'hélice α est en rouge et contient la zone conservée LARFAVDEHN ; les zones interagissant avec la protéase à cystéine CP sont en vert.

b) Fonctions

Les Phytocystatines ont pour rôle de réguler le turnover des protéines par les protéases à cystéine endogènes dans les organes de réserves comme les graines et les tubercules (Weeda *et al.*, 2009 ; Hwang *et al.*, 2009 ; Martinez *et al.*, 2009). Elles sont également impliquées dans l'inhibition de la mort cellulaire programmée chez le haricot (Solomon. 1999 ; Belenghi *et al.*, 2003). Les cystatines jouent un rôle important dans les mécanismes de défense des plantes en réponse aux contraintes biotiques ou abiotiques (Benchabane *et al.*, 2010). Elles sont impliquées dans l'inhibition des protéases à cystéines exogènes sécrétées par des herbivores, ou par des pathogènes lors de leur pénétration dans les tissus végétaux (Lawrence et Koundal, 2002 ; Habib et Khalid, 2007). Divers travaux ont montré que le gène est souvent surexprimé en réponse aux contraintes abiotiques comme les blessures (Botella *et al.*, 1996 ; Pernas. 2006 ; Hwang *et al.*, 2010 ; Jung *et al.*, 2010), l'excès de sel (Pernas. 2006 ; Megdiche *et al.*, 2009 ; Jung *et al.*, 2010), la sécheresse (Diop *et al.*, 2004 ; Huang *et al.*, 2007 ; Megdiche *et al.*, 2009), le froid (Pernas. 2000; Van der Vyver *et al.*, 2003 ; Zhang *et al.*, 2008) . La comparaison entre cultivars de Fabacées sensibles et tolérants à la sécheresse a montré que la tolérance est associée à une expression efficace du gène (Diop *et al.*, 2004). Les réponses sont variables selon les organes ou tissus et elles sont sous la dépendance de séquences *cis* promotrices qui ont été caractérisées (Hwang *et al.*, 2010).

PARTIE 2

Matériel et Méthodes

PARTIE 2 : Matériel et Méthodes

1 Matériel végétal

1.1 Conditions de culture et de récolte des fruits

Les ananas de 4 variétés MD2, Cayenne lisse (SC) et les hybrides Flh41 et Flh53 ont été cultivés en champ, dans une station appartenant au Pôle de recherche agroenvironnemental du Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD-PRAM) en Martinique (latitude 15°N, longitude 62°W).

Un chaulage du sol à hallosyte avec un amendement calco-magnésien (Ca^{2+} et Mg^{2+}), ainsi qu'une pulvérisation foliaire d'urée, de sulfate de potassium, $\text{K}_2\text{O}/\text{N}= 2,5$ et de fer ont été réalisés.



Figure 1 : Champ d'ananas d'une station CIRAD (Martinique)

Les fruits ont fait l'objet d'une sélection rigoureuse afin d'assurer une homogénéité de la taille des fruits, de leur couronne, de leur intégrité (indemne de maladie ou de blessures occasionnées par des ravageurs de culture) et de leur maturité (chapitre 1).

La récolte des fruits a eu lieu à des périodes où les conditions climatiques (hydrométrie, ensoleillement) sont adéquates pour favoriser le développement du BI de l'ananas après leur traitement en post-récolte.

1.2 Les traitements

Dès récolte, les fruits sont transportés avec précaution au laboratoire pour y être nettoyés, traités avec de l'hypochlorite de sodium (0,01 %), puis séchés.

Différents moyens physico-chimiques ont permis de sélectionner au laboratoire des fruits de maturité homogène ([chapitre 1](#)). Puis deux témoins ont été réalisés : des fruits fraîchement cueillis T_0 , utilisés immédiatement après leur désinfection, et des fruits conservés pendant 20 jours à 25°C T_{20} . Les fruits ont été également soumis à deux contraintes au froid : un traitement au froid pendant 10 jours à 9°C (F) ; et un traitement dit « de post-récolte » de 10 jours à 9°C puis 10 jours à 25°C (TPR).

Les lots témoins et traités ont été réalisés chacun avec 9 fruits pour chaque variété.

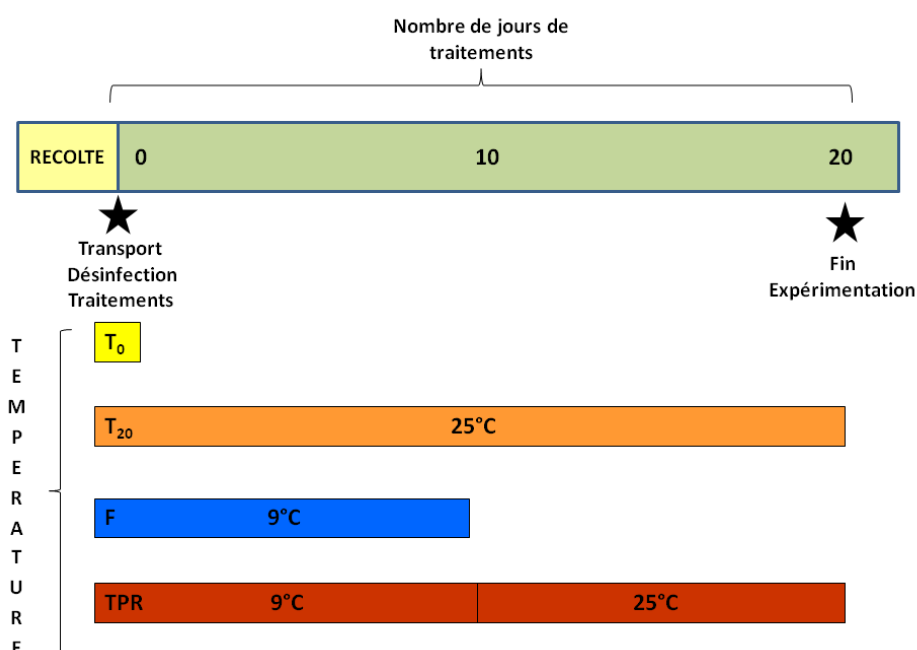


Figure 2 : Traitements des variétés d'ananas (T_0 : fruits fraîchement cueillis ; T_{20} : fruits sénescents de 20 jours à 25°C ; F : fruits 10 jours à 9°C ; TPR : fruits 10 jours à 9°C puis 10 jours à 25°C)

1.3 Echantillonnage

Après les différents traitements les fruits sont débarrassés de leur couronne, la peau est enlevée et la partie supérieure des fruits est éliminée.

Selon les besoins des expérimentations, les fruits sont découpés longitudinalement en 3 sections afin de s'affranchir de l'hétérogénéité de la composition et de la maturité des fruits (bas en haut, multi-fruits), mais également d'une exposition variable au champ.

Les échantillons des fruits sensibles au BI, sont prélevés dans ces 3 sections avec une répartition homogène des zones brunes, translucides, et indemnes de BI.

Les échantillons destinés aux dosages enzymatiques et à l'analyse de l'expression des gènes sont rapidement plongés dans de l'azote, puis sont conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

2 Analyses physiologiques

2.1 Caractéristiques chimiques

2.1.1 Mesure d'extraits secs solubles

La mesure d'extraits secs solubles ou « brix » est exprimée en degré. Elle reflète le taux de sucre des fruits et est réalisée à l'aide d'un refractomètre (PR-32 ATAGO paletto) sur une goutte de jus d'ananas.

2.1.2 Mesure d'acidité libre titrable

L'acidité libre titrable des fruits est réalisée sur 10 ml de jus d'ananas pressé et filtré obtenu à partir de sections transversales du fruit. Ce jus est neutralisé avec du NaOH 0,1 N jusqu'à l'obtention d'un pH 8 en présence de phénolphthaléine. Les résultats sont exprimés en milliéquivalents pour 100 ml de jus d'ananas (meq.100 ml⁻¹).

2.2 Evaluation de l'intégrité des membranes cellulaires

La mesure des efflux d'électrolytes à partir des membranes est réalisée à l'aide d'un conductimètre (Consort C561/C562) calibré avec KCl 0,01 M et un milieu de conductance ajusté à la mesure de brix des fruits. Une étude préliminaire de cette solution a été réalisée avec de l'eau distillée, du mannitol à 300 mOsmol/l ou un brix ajusté avec du saccharose. D'après les résultats le «milieu brix» est le plus efficace. Les mesures de conductivité sont réalisées dans le cas de 4 variétés d'ananas : MD2, SC, Flh53 et Flh41 à raison de 3 réplicas biologiques et techniques par traitement.

Chaque fruit est découpé délicatement afin d'extraire 5 g de pulpe sous forme de petits cubes de 0,5 cm de côté. Ils sont disposés sur un papier absorbant afin d'éliminer le contenu des cellules éclatées. Les cubes de fruits sont placés sous agitation dans 20 ml de milieu suspension ajusté suivant la valeur de brix (sol). Les mesures sont effectuées toutes les 15 minutes pendant 2h (L_t). Puis le dispositif est placé à -20°C pendant 24h, puis remis pendant une durée de 3h à température ambiante ; une nouvelle mesure de conductance (efflux totaux) est alors effectuée (L_0). Les résultats sont exprimés selon la formule de dommages relatifs (Relative Injury Index R) : $RII = ((L_t - sol)/L_0)$.

3 Analyses biochimiques

3.1 Extraction des protéines et dosages enzymatiques

3.1.1 Extraction de protéines adaptée aux dosages enzymatique de PPO, POD et APX

L'extraction de protéines est réalisée avec 100 g de pulpe de fruit dans un mélange contenant : PVP 2 %, NaCl 0,75 g, acide ascorbique 0,88 g, tampon phosphate (4°C) 50 ml à 0, 2 M (pH 6, 8), PMSF 150 mg. L'extrait est filtré sur une membrane de nylon, et les résidus sont extraits de nouveau avec du tampon phosphate (4°C) 20 ml à 0, 2 M (pH 6, 8). Les 2 filtrats sont mélangés et centrifugés 20 000 x g pendant 25 min à 4°C. Le surnageant est précipité dans du sulfate d'ammonium à 30 %, puis à 90 % puis dialysé 2 fois (Amicon ®) sur une membrane (30 kDa).

3.1.2 Dosage enzymatique et séparation de protéines

a) La polyphénol oxydase PPO (pyrocatechol)

La mesure d'activité de la PPO est réalisée dans un mélange réactionnel contenant : tampon phosphate 0,2 M (pH 6,8), pyrocatechol 50 mM, et 200 μ l d'extrait protéique. L'activité enzymatique est lue à $\lambda_{420\text{ nm}}$ pendant 4 min à 24°C. Le blanc contient uniquement du tampon phosphate 0,2 M à pH 6,8, et du pyrocatechol 50 mM. 1 unité de PPO = 0,1 $\Delta A_{420\text{ nm}} \cdot \text{min}^{-1}$.

b) La guaiacol peroxydase POD

La mesure d'activité de la POD est réalisée dans un mélange réactionnel contenant : tampon citrate 0,2 M (pH 5), guaiacol (2-methoxyphénol) 18 mM, H_2O_2 2 mM, et 200 μ l d'extrait protéique. L'activité enzymatique est lue à $\lambda_{470\text{ nm}}$ pendant 2 min à 24°C et le blanc contient uniquement tampon citrate 0,2 M (pH 5) et du guaiacol (2-methoxyphénol) 18 mM. 1 unité de POD = 1 $\Delta A_{470\text{ nm}} \cdot \text{min}^{-1}$.

c) Séparation des protéines de PPO et POD en condition non dénaturante

Les extraits protéiques de chair d'ananas sont séparés par électrophorèse non dénaturante (PhastSystem®) sur des mini-gels gradients de 8-25 % de polyacrylamide. Les échantillons sont dilués (0,7 et 1,5 mg/ml pour POD et PPO respectivement) et colorés avec du bleu de nitrophénol (10 %) afin de suivre leur migration. Les échantillons ainsi préparés (2 μ l) sont déposés sur gel à l'aide de peignes à gouttières. Les protéines migrent sous 250 V pendant 30 min à 15°C.

d) Milieu de révélation des activités protéiques PPO et POD

Les mini-gels gradients sont immergés dans deux milieux de révélation permettant de visualiser les différentes protéines de PPO et POD. Ceux-ci contiennent respectivement :

- pyrocatechol 40 mM, tampon trizma maléate 25 mM (pH 7), de CuCl_2 2 mM et de l'eau distillée.
- tampon citrate à 0.2 M (pH 5), guaiacol 69 mM et H_2O_2 23 mM.

Les gels sont préfixés dans un mélange éthanol/acide acétique et eau (20V/5V/75V) afin de limiter la diffusion des protéines. La révélation des protéines de POD est relativement rapide (20 min), et elle est plus longue pour la PPO (1 à 3 h).

e) *L'ascorbate peroxydase APX*

La mesure d'activité enzymatique est réalisée dans un mélange réactionnel contenant : tampon phosphate 0,05 M (pH 6,8), acide ascorbique 0,5 mM, H_2O_2 0,5 mM, et 200 μl d'extrait protéique. La mesure d'activité de l'APX a été réalisée en suivant l'oxydation de l'ascorbate par le peroxyde d'hydrogène à $A_{\lambda 420 \text{ nm}}$. L'activité enzymatique spécifique de l'APX est exprimée en $\Delta A_{420\text{nm}} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de prot}^{-1}$.

3.1.3 *Extraction des protéines et dosage enzymatique de la PAL*

L'extraction des protéines est réalisée avec 10 g de pulpe de fruit dans un mélange contenant : tampon borate 0,1 M (pH 8,8), acide ascorbique 5 mM, EDTA 2 mM et du PVP 1 %. Le broyat est filtré, puis centrifugé à 14 000 g pendant 20 minutes à 4°C. Le surnageant a été additionné de sulfate de protamine 1 %, sous agitation douce pendant 10 min à 4°C. Après centrifugation à 13 000 x g pendant 10 min à 4°C, le surnageant est conservé à 4°C pour les mesures d'activités enzymatiques.

La mesure d'activité spécifique de la PAL a été réalisée selon la méthode décrite par [Zhou et al. \(2003\)](#) avec quelques modifications. Un mélange contenant du tampon borate 0.1 M (pH 8,8) et de la L-phénylalanine 60 mM est préincubé à 40°C pendant 15 minutes, puis 500 μl d'extrait est ajouté. Le mélange est incubé à 40°C pendant 1h et les réactions sont stoppées par ajout de 500 μl de HCl 6 N. L'acide cinnamique libéré est dosé à $A_{\lambda 290 \text{ nm}}$. L'activité spécifique de la PAL s'exprime en $\Delta A_{290\text{nm}} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg de prot}^{-1}$.

3.1.4 Extraction des protéines et dosage enzymatique des enzymes du catabolisme protéique

a) Dosage de la protéase à cystéine

L'extraction des protéines est réalisée avec 100 mg de poudre d'ananas dans 500 µl de milieu contenant : PVP 3 %, tampon Hepes 0,1 M (pH 7,3), DTT 2 mM. Le mélange est homogénéisé 2 min, puis centrifugé à 14 000 x g à 4°C pendant 20 min (Himac, VWR, CT 15RE).

Le milieu réactionnel contient : tampon Hepes 0.1 M, PMF 10 %, EDTA 5 mM, L-cysteine 5 mM, substrat spécifique Bz-Phe-Val-Arg-pNA (Sigma-Aldrich, B7632) 200 µg.ml⁻¹ final et 50 µl d'extrait protéique.

L'activité enzymatique est dosée à $A_{\lambda 405 \text{ nm}}$ toutes les 30 s pendant 30 min (Tecan, infinite ® M1000). Le taux de p-nitroaniline libéré est calculé en utilisant $\epsilon = 8480 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. L'activité catalytique (CA) est calculée à partir de l'absorbance et de la pente (absorbance vs temps) ($\Delta A.s^{-1}$). L'activité enzymatique spécifique (SA) est exprimée en nkat. mg⁻¹ selon la formule : $SA = [CA \times 1000] / \text{quantité de protéines}$.

b) Dosages de la protéase à acide aspartique

L'extraction de protéines est réalisée avec 200 mg de poudre d'ananas dans 1 ml de milieu contenant : tampon citrate 50 mM (pH 4), PVP 1 %, β mercapto-ethanol 0.5 %, et du triton (X-100) 0.00125 %. Le mélange est homogénéisé pendant 2 min et centrifugé à 14 000 x g pendant 20 min à 4°C (Himac, VWR, CT 15RE). Le surnageant est conservé à 4°C jusqu'à utilisation.

Le milieu réactionnel contient: tampon acétate de sodium 50 mM (pH 4,2), NaCl 2 mM et un substrat synthétique spécifique Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Phe(NO₂)-Ala-Leu (solubilisé dans du DMSO) 0,1 mM. L'extrait enzymatique est pré-incubé à 37°C pendant 15 minutes. L'activité enzymatique est dosée à $A_{\lambda 300 \text{ nm}}$ à 37°C pendant 30 min (Tecan, infinite ® M1000).

3.1.5 Dosage de protéines des extraits

La mesure de la quantité des protéines est déterminée selon le protocole de Bradford (1976), avec de la BSA (Bovine Serum Albumine) comme standard et le réactif Biorad Protein assay (Biorad) selon les indications du fournisseur.

4 Analyses moléculaires

4.1 Préparation des échantillons

Les échantillons de pulpe d'ananas sont broyés en fine poudre dans de l'azote liquide à l'aide d'un mortier et d'un pilon préalablement lavés à l'hypochlorite de sodium (5 %), autoclavés et chauffés pendant 3h à 180°C (inhibition des RNases) puis refroidis.

4.2 Extraction des ARN totaux

L'extraction des ARN totaux est réalisée en condition exempte de RNase, pour cela l'ensemble du matériel utilisé a été préalablement autoclavé puis chauffé à 85°C dans une étuve. La composition des échantillons d'ananas, rend l'extraction d'ARN complexe en raison d'une très forte teneur en sucre, en phénols et en eau. Différentes méthodes d'extraction ont été testées (extraction classique en kit « RNeasy plant mini kit », extraction au trizol, étapes de précipitation des sucres.....). Ces méthodes n'ont pas permis d'obtenir des ARN de qualité et quantité suffisantes (15 à 20 ng/µl). Ainsi les ARN totaux ont été extraits en modifiant largement la méthode du kit RNeasy plant mini kit (Qiagen, France). La quantité de poudre utilisée pour l'extraction sur pulpe d'ananas a été multipliée par 4 par rapport aux conditions habituelles (de l'ordre de 100 mg). Afin de ne pas obstruer les colonnes du kit, l'extraction des ARN totaux a été réalisée en 2 fois (200 mg de poudre). Après la lyse des cellules dans un tampon contenant de l'isothiocyanate de sodium (dénature et inactive les RNases), une étape de centrifugation à 14 000 x g pendant 15 min à 4°C a été ajoutée afin d'obtenir un surnageant limpide. Après l'élimination des débris cellulaires, les ARN des 2 extractions sont concentrés par fixation sur une membrane de silice d'une micro-colonne unique en présence d'une forte concentration saline. Les extraits d'ARN totaux sont traités à la DNase selon les instructions

du manuel. Des lavages successifs à l'éthanol permettent d'éliminer les contaminants. Enfin les ARN totaux sont élués dans 50 µl d'eau exempte de nucléases.

4.3 Contrôle de la qualité et de la quantité des ARN

4.3.1 Analyse quantitative des ARN totaux

La concentration des ARN totaux a été déterminée par la mesure 1,5 µl d'extrait à $A_{\lambda_{260\text{ nm}}}$ (Nanodrop, ND1000, USA). L'appareil mesure la concentration des échantillons en utilisant l'équation de Beer-Lambert modifiée afin que le coefficient d'extinction utilisé ait comme unité des ng-cm/ml : $c = (A \times e)/b$. Où 'c' est la concentration en acides nucléiques (ng/ml), 'A' est l'absorbance, 'e' le coefficient d'extinction dépendant de la longueur d'onde (ng-cm/µl) et 'b' est le trajet optique. Dans le cas des ARN la valeur de 'e' est 40 ng-cm/µl et celle de 'b' 1 mm.

4.3.2 Analyse qualitative des ARN totaux

La pureté des ARN a été évaluée grâce au ratio $\lambda_{260/280}$, celui-ci doit être voisin de 2. La migration des ARN sur gel d'agarose 1 % a permis de vérifier l'intégrité des ARN totaux. Celui-ci est préparé avec du tampon TAE 0,5 X (tampon TAE 50 X, Tris acétate 2 M, EDTA 0,05, pH 8,3 ; Qiagen) contenant du bromure d'éthidium à 0,05 % (Biochemika). Les ARN totaux ainsi qu'un marqueur de taille de 200 à 10 000 bp (Smart Ladder®, Eurogentec, France) sont déposés sur le gel, puis migrent par électrophorèse (Mupid ® one), pendant 30 min à 100 V. Les acides nucléiques sont révélés sous UV (Gel Doc, Biorad, France). L'intégrité des ARN totaux extraits a été vérifiée via celle des ARNr (16 S et 25 S).

4.4 Synthèse des ADNc par reverse transcription (RT)

La reverse transcription, consiste à synthétiser une molécule d'ADN complémentaire (ADNc) à partir d'ARNm en utilisant une enzyme : la transcriptase inverse (ou « reverse transcriptase ») découverte chez les virus à ARN. La reverse transcription a été réalisée au moyen du « kit Omniscript® Reverse transcription » (Qiagen, France). Les ARN totaux sont préalablement chauffés pendant 5 min à 65°C puis traités avec 40 µl de mélange réactionnel

contenant : dNTP (5 mM) 4 µl, amorces oligo-dT (10 µM) 2 µl, tampon de réaction (10 X) 4 µl, reverse transcriptase 2 µl, inhibiteur de RNase (10 U) 1 µl. Les échantillons d'ARN totaux sont homogénéisés et traités tous ensemble. La réaction est réalisée à partir d'1 µg d'ARN totaux, à 37°C pendant 1 heure (Mastercycler, Eppendorf, France).

4.5 Stratégie d'obtention de nouvelles séquences ADNc partiels

Le génome de l'ananas n'est pas entièrement séquencé. Certaines séquences nucléotidiques sont obtenues à partir de la base de données GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), d'une base de données Australienne crée par Moyle *et col.* (2005) (<http://www.pgcl.com.au>). En absence de gène séquencé des alignements de séquences multiples ont été réalisés dans le cas de monocotylédones comme le riz et le maïs provenant de la base de données GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). La recherche de zones consensus a été faite à l'aide du logiciel d'alignement multiple Clustalw (http://www.infobiogen.fr/services/analyseseq/cgi-bin/clustalw_in.pl).

4.6 Dessin d'amorces pour la PCR semi quantitative et la PCR en temps réel qPCR

Des couples d'amorces spécifiques (sens et antisens) de 20 à 24 nucléotides sont réalisés sur des séquences nucléotidiques correspondant à différents gènes obtenues dans les bases de données en prenant en compte des règles classiques : pourcentage de résidus G et C d'environ 50 %, TM (température d'hybridation des oligonucléotides à la matrice d'ADN) entre 56 et 62°C, pas de séquences répétées de nucléotides (comme AAAAAAAAAA ou GGGGGGGG), ni de séquences palindromiques. Afin de vérifier la qualité des amorces, le logiciel Netprimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>) a été utilisé permettant de détecter la formation d'épingle à cheveux, et la formation de dimère d'amorces.

Des amorces dites « dégénérées » sont également dessinées lorsqu'il n'existe pas de séquences connues du gène cible. Dans ce cas, les séquences sont choisies au niveau des zones consensus révélées par un alignement de séquences multiples proches du gène cible, en se basant sur le code de dégénérescence des codons. Les amorces sont évaluées en PCR classique pour l'obtention d'un produit PCR unique, de taille attendue. Puis une sélection plus fine est mise au point pour la mesure d'expression des gènes en qPCR par une méthode dite

de « TM calling », consistant à produire un seul pic lorsque les amorces amplifient une séquence spécifique et plusieurs pics lorsque les amorces ne sont pas assez spécifiques, ces dernières seront alors éliminées.

4.7 Amplification des gènes par réaction de polymérisation en chaîne PCR semi-quantitative

4.7.1 La réaction

Le volume réactionnel de 20 µl, contient : ADNc matrice 50 ng, amorces spécifiques (sens et antisens) 10 pmol, « Go Taq®Green Master Mix » (Promega, France) 10 µl et de l'eau distillée stérile.

Le PCR Master Mix est composé de *Taq* DNA Polymerase (*Thermus aquaticus* polymérase) à 50 unités/ml, de 400 µM de chacun des dNTP, de 3 mM de MgCl₂ et d'un tampon de réaction (pH 8,5).

Les réactions de PCR (thermocycler, Mastercycler Gradient, Eppendorf) sont réalisées selon le programme suivant : dénaturation 95°C à 5 min ; 30 ou 35 cycles [dénaturation : 95°C, 30 sec ; hybridation : température variable selon les amorces, 30 sec ; polymérisation : 72°C, 30 sec à 1 min 30 sec (selon la taille du fragment à amplifier)] ; extension finale : 72°C, 10 min ; et conservation à 18°C.

4.7.2 Analyse des produits PCR

Une électrophorèse sur gel d'agarose 2 % (Sigma) avec du tampon TAE 0,5 X (tampon TAE 50X, Tris acétate 2M, EDTA 0,05, pH 8,3 ; Qiagen) contenant du bromure d'éthidium à 0,05 % (Biochemika) est utilisée pour visualiser les amplicons d'ADN obtenus par PCR et le marqueur de taille adapté à l'expérience (50 bp à 500 bp, Gelpilot Qiagen (239025) ; 100 bp à 1 500 bp, BenchTop Promega (G8291). La migration des échantillons sur le gel est réalisée 30 min à 100 V (Mupid ® one) et observée sous UV (Gel Doc, Biorad, France).

4.8 Clonage des produits d'amplification par PCR

4.8.1 Ligation des produits d'amplification PCR dans un vecteur de clonage

Les produits des amplifications sont clonés en utilisant : vecteur pGEM-T Easy System I (Promega, France) (Annexe 1) 1 µl, tampon de ligation (2X) 5 µl, ligase (Promega) 1 µl et 3 µl de produit PCR. Le mélange est incubé 1h à température ambiante.

4.8.2 Préparation de bactéries compétentes

Les bactéries *Escherichia coli* de souche GT 869, sont rendues compétentes par un traitement au CaCl_2 50 mM, permettant d'augmenter la perméabilité membranaire des bactéries. Les bactéries sont mises en culture toute la nuit à 37°C dans 2 ml de milieu LB liquide (Annexe 2). Puis cette culture bactérienne est additionnée de 120 ml de LB et mise en culture sous agitation (150 tour/min) jusqu'à ce que le milieu devienne turbide ($A_{\lambda_{600 \text{ nm}}} = 0.8$ à 1). Puis, la culture est centrifugée à 4000 x g pendant 10 min (4°C). Le culot est suspendu dans 6 ml de CaCl_2 50 mM et agité toute la nuit dans de la glace. La conservation des bactéries se fait à -80°C en présence d'1 ml de glycérol.

4.8.3 Transformations des bactéries compétentes

Le vecteur recombiné est inséré par choc thermique dans des bactéries compétentes d'*Escherichia coli* souche GT869. Pour cela 2 µl de produit de la réaction de ligation est ajouté à 100 µl de bactéries compétentes. Ce mélange est mis 5 min dans de la glace, puis 5 min à 37°C, et 1 min dans la glace. Puis 400 µl de milieu LB liquide sont ajoutés, et les bactéries sont mises en culture sous agitation douce (100 rpm) pendant 20 min à 37°C. Après centrifugation à 14 000 x g pendant 2 min, une partie de surnageant (350 µl) est éliminée, le culot est vortexé et la suspension est étalée sur milieu LB solide (Annexe 2) additionné de carbénicilline (100 µg.ml⁻¹, agent de sélection), d'un inducteur de l'opéron lactose, l'isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG ; 100 mM), d'un substrat de la β-galactosidase, le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-Dgalactopyranoside (X-Gal ; 4 % M/V). Les bactéries sont incubées à 37°C toute la nuit.

4.8.4 Préparation de l'ADN plasmidique

Une sélection de clones bactériens blancs est réalisée, afin de s'assurer par PCR semi quantitative et migration sur gel d'agarose 2 %, de la présence du fragment de cDNA inséré préalablement. Une fois les bactéries recombinées vérifiées, une mise en culture est réalisée dans 3 ml de milieu LB additionné de carbénicilline ($100 \mu\text{g.ml}^{-1}$), sous agitation (150 rpm) à 37°C, toute la nuit. Puis l'ADN plasmidique des clones bactériens est extrait à l'aide du kit « Miniprep wizard plus SV » (Promega, France)

La solution « Cell Lysis Solution » provoque la lyse des cellules bactériennes par du lysozyme. Une protéase alcaline inactive les endonucléases et autres protéines intracellulaires qui pourraient affecter la qualité de l'ADN isolé. Cet extrait bactérien brut est déposé sur une colonne d'affinité pour l'ADN plasmidique. La colonne est lavée avec une solution (« Column Wash »), contenant de l'éthanol à 95 %. L'ADN plasmidique est élué avec de l'eau sans nucléase. La concentration en ADN plasmidique est déterminée par la mesure de 1,5 μl d'extrait à $A_{260 \text{ nm}}$ (Nanodrop, ND1000, USA).

4.8.5 Séquençage d'ADN et analyse de séquences nucléotidiques

Les ADN plasmidiens sont séquencés par Genoscreen (Lille, France). Le séquençage est réalisé sur les 2 brins d'ADN à l'aide d'amorces comme SP6 et T7 appartenant au plasmide pGEM-TEasy. Les séquences nucléotidiques obtenues sont vérifiées par reconnaissance des amorces utilisées pour réaliser l'amplification mais également par un blast en nucléotides (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

4.8.6 Amplification d'une séquence partielle d'ADNc par RACE

L'amplification d'une séquence partielle d'ADNc d'une protéase à acide aspartique a été réalisée en utilisant le kit 5'3'RACE 2nd génération (Roche, France) et le kit Expand High Fidelity ^{PLUS} PCR system (Roche, France). La technique de RACE (Rapid Amplification of either 5' or 3' cDNA Ends) consiste à amplifier en 2 étapes importantes les extrémités 5' et 3' d'une séquence partielle d'ADNc grâce à l'utilisation d'amorces spécifiques sens (SP4 et SP5) et antisens (SP1, SP2 et SP3) chevauchantes de cette séquence (Figure 3, Tableau 1).

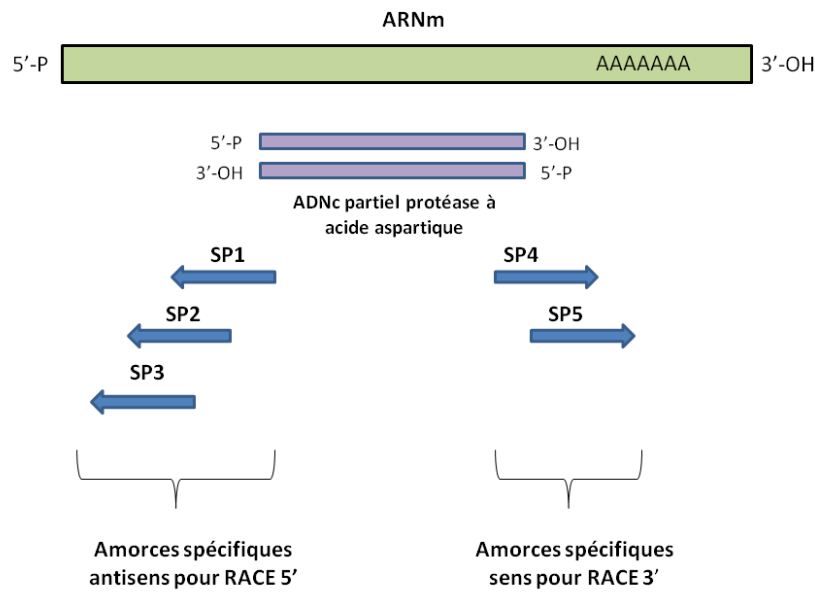


Figure 3 : Amplification d'une séquence partielle d'ADNc d'une protéase à acide aspartique par RACE 5' et 3'

Nom	Sequences	RACE
SP1	GAGCAGATTTTCCCTGGTTGAAC	RACE 5'
SP2	CCTGGTTGAACCTCTGCAAG	
SP3	TTGAACCTCTGCAAGCAACATTG	
SP4	ACCTCAACCAGCTATGCGAGAAA	RACE 3'
SP5	CAGCTATGCGAGAAACTCCCTA	

Tableau 1 : Amorces utilisées pour le RACE

a) Amplification de l'extrémité 5' de l'ADNc de la protéase à acide aspartique

Le premier brin d'ADNc est synthétisé dans un volume réactionnel de 20 µl contenant : ARN totaux 500 ng, amorce spécifique antisens SP1 de l'ADNc partiel de protéase à acide aspartique 1 µl, enzyme (Transcriptor Reverse Transcriptase) 1 µl, tampon de synthèse cDNA 4 µl, un mélange de dNTP 2 µl et de l'eau distillée. Le mélange est incubé 1 h à 55°C

Une purification du premier brin d'ADNc est réalisée à l'aide du kit « High Pure PCR Product Purification Kit » (Roche, France) afin d'éliminer les nucléotides et les amorces non utilisées.

Une queue poly A est ajoutée à l'extrémité 5' terminale de l'ADNc par l'ajout de terminal transférase. Pour cela cDNA purifié 19 µl, tampon de réaction (10x) 2,5 µl, d'ATP 2 mM 2,5 µl sont mélangés et mis à incuber 3 min à 94°C. Puis la terminal transférase 1 µl est ajoutée et le tout est incubé 30 min à 37°C. Enfin l'enzyme est inactivée par une incubation du mélange à 70°C pendant 10 min.

Une première PCR est réalisée par l'hybridation de sondes : « Oligo dT-anchor », qui se lie à la queue polyA du cDNA de la protéase à acide aspartique et d'une deuxième amorce spécifique antisens SP2. La réaction se fait dans un volume réactionnel de 50 µl contenant : ADNc ayant la queue polyA 5 µl, Oligo dT-anchor 1 µl, SP2 1µl, éléments du kit Expand High Fidelity^{PLUS} PCR system (Roche, France) [dNTP 1 µl, Taq polymérase 0,75 µl, tampon de la réaction (5x) 10 µl] et de l'eau distillée.

La réaction de RT-PCR est réalisée (Thermocycler « Mastercycler Gradient, Eppendorf) selon le programme suivant : activation initiale de la PCR : 94°C, 2 min ; 35 cycles [dénaturation : 94°C, 15 s ; hybridation : température variable selon les amorces, 30 sec ; polymérisation : 72°C, 45 sec à 1 min 30 sec (selon la taille du fragment à amplifier)] ; extension finale : 72°C, 7 min ; conservation : 18°C.

Puis une seconde PCR est réalisée à partir du produit de la première PCR (1 : 20) afin d'augmenter les chances d'obtenir un seul fragment d'intérêt. Le mélange réactionnel et le programme PCR sont similaires. Néanmoins le mélange réactionnel contient le produit PCR dilué 1 µl, une amorce spécifique de « Oligo dT-anchor » : « PCR anchor » 1 µl et une troisième amorce spécifique antisens SP3 1 µl.

b) Amplification de l'extrémité 3' de l'ADNc de la protéase à acide aspartique

Le premier brin d'ADNc de la protéase à acide aspartique est synthétisé par hybridation d'une sonde « Oligo dT-anchor » qui se fixe à la queue polyA de l'ARNm (déjà présente en extrémité 3' de l'ARNm). Le mélange réactionnel de 20 µl contient : ARN totaux 500 ng, tampon de la réaction 4 µl, mélange dNTP 2 µl, amorce « Oligo dT-anchor » 1 µl, enzyme « transcriptor reverse transcriptase » 1 µl et d'eau distillée. Le tout est incubé 1 h à 55°C puis 5 min à 85°C.

La première PCR est réalisée par l'hybridation de sondes : « PCR anchor », qui se lie à la queue polyA du cDNA de la protéase à acide aspartique et d'une deuxième amorce spécifique sens SP4. La réaction se fait dans un volume réactionnel de 50 µl contenant : ADNc ayant la queue polyA 5 µl, PCR anchor 1 µl, SP4 1 µl, éléments du kit Expand High Fidelity^{PLUS} PCR system (Roche, France) [dNTP 1 µl, Taq polymérase 0,75 µl, tampon de la réaction (5x) 10 µl] et de l'eau distillée.

Le programme PCR est le même que celui de la 5'RACE. Egalement une deuxième PCR est réalisée avec du produit de la première PCR (1:20) sur le même principe. Le mélange réactionnel contient cette fois : produit PCR dilué 1 µl, une amorce spécifique de « Oligo dT-anchor » : « PCR anchor » 1 µl et une deuxième amorce spécifique sens SP5 1 µl.

4.8.7 Amplification des gènes PCR en temps réel qPCR

a) Etapes préliminaires permettant de normaliser l'étude q PCR

- Normalisation des ARN totaux (Nanodrop, ND1000, USA) et contrôle par électrophorèse sur gel d'agarose 1 %
- Préparation des ARN dans un même volume, même conditions pour la reverse transcription
- Matrice de même volume et concentration pour les réactions de qPCR (25 ng/µl)
- Amorces vérifiées par le « TM calling »
- Courbe standard sur ADN plasmidique généré à partir d'une solution mère de 1 ng/µl, puis réalisation de dilutions en cascades.
- Sélection d'un gène de référence pour l'interprétation des résultats et vérification de sa stabilité par un logiciel GenNorm (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>).

b) La réaction

La réaction de PCR en temps réel ou qPCR est une technique quantitative qui permet d'analyser finement l'expression de gènes cibles. La courbe d'amplification est donnée par la fluorescence mesurée à 530 nm en fonction du nombre de cycles. Les valeurs de calcul pourront donc être prises avant le point d'inflexion c'est à dire quand la quantité d'amplicons mesurée est encore directement proportionnelle à la quantité de départ.

La réaction s'effectue dans des capillaires de 20 µl (« Light Cycler® Capillaries » ; Roche, France) avec un mélange réactionnel d'un volume 10 µl contenant : ADNc 1 µl (25 ng d'ARN totaux), deux amorces spécifiques 5 pmol de chacune et du « Light Cycler® Fast Start DNA Master^{PLUS} SYBR Green 1 » (2 µl, contenant le tampon et l'enzyme « FastStart Taq DNA Polymerase » (Roche, France).

Les réactions de qPCR sont réalisées dans l'appareil LightCycler 2.0 (Roche, France) selon le programme suivant : activation initiale de la PCR : 95°C, 10 min ; 40 cycles [dénaturation 95°C, 20 s ; hybridation : température variable selon les amorces, 20 s ; polymérisation : 72°C, 20 s] La courbe de fusion est établie entre 54 °C et 95°C afin de vérifier pour chaque réaction d'amplification la spécificité de l'amplification

c) Quantification relative de l'expression des gènes

L'expression relative du gène d'intérêt est normalisée à l'aide du gène de référence préalablement sélectionné (actine) selon le rapport (Pfaffl. 2001):

$$((E_{\text{cible}})^{\Delta C_{\text{t cible}} (\text{témoin-traité})}) / ((E_{\text{ref}})^{\Delta C_{\text{t ref}} (\text{témoin-traité})}).$$

Où E et E' sont respectivement les efficacités d'amplification du gène cible et du gène de référence et Ct le nombre de cycles après lequel la fluorescence atteint une valeur seuil fixée par l'appareil.

PARTIE 3

Résultats

CHAPITRE 1

Mise au point du système expérimental

INTRODUCTION

L'ananas est un fruit non-climactérique, qui dès la récolte ne mûrit plus mais entre en sénescence (Laville. 1994). La détermination de l'état de maturité des ananas est délicate et complexe. Elle diffère selon les variétés, les conditions climatiques, les itinéraires techniques (induction florale), mais également au sein même d'un champ. Le stade de maturité lors de la récolte des ananas est capital puisqu'il détermine les qualités organoleptiques des fruits (arôme, ratio sucre/acidité) et leur résistance au transport (Wijesinghe et Sarananda. 2002). De plus le stade de maturité conditionne la sensibilité des ananas au brunissement interne (BI) (Teisson et Combres. 1979).

L'exportation des ananas frais par bateau nécessite de disposer de fruits justes mûrs pouvant subir le transport et la mise en vente sur les étals. Les fruits tropicaux comme l'ananas sont très périssables et nécessitent des conditions optimales de récolte, de manipulations et un traitement au froid indispensable pour limiter la sénescence des fruits et leur dégradation due aux pathogènes.

Cette première étude a pour objectif de parvenir à établir un système expérimental adapté à l'analyse fine des processus impliqués dans le BI de l'ananas.

1 Matériel et Méthodes





1.1 Les variétés d'ananas

Les 4 variétés d'ananas MD2, Smooth Cayenne SC (Cayenne Lisse), et les hybrides Flh41 et Flh53 ont été récoltées dans une station de recherche du CIRAD (Centre International de la Recherche Agronomique pour le Développement) en Martinique. Les variétés diffèrent selon leur aspect extérieur, leurs qualités organoleptiques et agronomiques (Tableau 1).

Deux variétés MD2 et SC sont majoritairement commercialisées dans le monde pour le marché des fruits frais. La variété SC est produite pour la transformation et pour l'exportation d'ananas frais. La variété MD2 (73-114) créée en 1970 par Davis et Williams est issue d'un croisement entre deux hybrides 58-1184 et 59-443 eux même obtenus à partir de différentes

variétés dont la variété Cayenne lisse (Bartholomew, 2009). Elle supplante depuis quelques années la variété SC et est très présente sur le marché européen des ananas frais (Rebolledo-Martinez *et al.*, 2005). Les hybrides Fhl41 et Fhl53 ont été créés par le CIRAD de Martinique. Fhl41 fait l'objet d'un brevet (n°USPP12, 861 P2) déposé le 20 août 2002 sous le nom « RL41 ». Cette variété a été créée par Chantal Cloison en 1988, grâce à une pollinisation artificielle entre les variétés : Cayenne lisse « HA10 » et Manzana « CO24 ».

Tableau 1 : Les 4 variétés d'ananas MD2, SC, Flh53 et Flh41 sélectionnées pour l'étude du BI

MD2	SC	Flh53	Flh41
			

1.2 Les conditions de récolte des fruits

La récolte des fruits est gérée selon les périodes de traitement à l'induction florale (TIF) et le nombre de « degré jours » accumulés par les fruits. Les paramètres comme l'homogénéité de la taille des fruits et la couleur externe de ceux-ci sont également pris en compte.

Les fruits présentant des blessures liés à la manipulation, aux ravageurs des cultures ou aux pathogènes sont évidemment écartés. Dès la récolte, les fruits sont rapidement transportés au laboratoire pour y être nettoyés, désinfectés et subir les traitements liés à l'expérimentation.

1.3 Détermination de la maturité des fruits en champ

Le paramètre de coloration externe des fruits a été utilisé dans un premier temps pour constituer un groupe d'ananas potentiellement mûrs. Ceux-ci ont fait l'objet d'une seconde sélection basée sur l'état des « yeux » des fruits notamment lorsque ceux-ci changent d'aspect. Un échantillon représentatif de ce pool d'ananas a été coupé au niveau du diamètre le plus large des fruits. Une appréciation visuelle de la maturité des fruits a été réalisée afin de s'assurer de leur intégrité, de la couleur adéquate de la chair mais également de l'absence de

translucidité. Enfin pour évaluer rapidement la teneur en sucre, l'acidité et le parfum nécessaire à une bonne qualité des fruits ces derniers ont également été goûtés.

Remarque : les analyses physiologiques réalisées dans ce chapitre ont été détaillées précédemment dans le matériel et méthodes général.

2 Résultats et Discussion

2.1 Le stade de maturité des fruits

La maturité des ananas est difficile à déterminer bien que les outils classiques basés sur le nombre de « degré jours » accumulés par les fruits et le moment où a eu lieu l'induction florale sont des indications précieuses. Cependant d'après les résultats, ces paramètres sont insuffisants. De plus la maturité des fruits au sein même d'un champ s'est révélée très hétérogène, due au moins en partie à une robustesse variable des plantes au moment de l'induction florale.

La coloration extérieure des fruits nous a permis d'évaluer le stade de maturité de ceux-ci à l'aide d'une échelle colorimétrique pour la variété Cayenne lisse (Soler, 1992) et MD2 (COLEACP-UGPIP, 2009a). Le changement de couleur de la peau, de vert à jaune autour des yeux du fruit pour MD2 et de vert à franchement jaune orangé pour Cayenne lisse a été un premier critère de sélection au champ. Nous avons pris soin de sélectionner les ananas présentant 20 % de cette coloration, de la base vers le haut du fruit. En effet si la coloration des fruits est de l'ordre de 40 %, les ananas sont sur-mûrs, présentent de faibles qualités organoleptiques comme un ratio sucre/acidité faible et entrent rapidement en sénescence (Wijesinghe et Sarananda, 2002). Néanmoins ces critères de coloration extérieure des fruits se sont révélés insuffisants d'après les tests organoleptiques au champ et en laboratoire. Ces critères sont par ailleurs inadaptés pour les autres variétés étudiées comme Flh53 et Flh41.

Pour la majorité des fruits sélectionnés un changement de l'aspect des yeux notamment lorsque ceux-ci sont pleins et dilatés a été un paramètre important pour l'évaluation de la maturité des fruits. Ce type de méthode non destructive a fait l'objet d'études de modélisation des spirales des fruits d'ananas et de l'état des yeux mettant en jeu des algorithmes puissants (Kaewapichai *et al.*, 2007). Une section transversale des fruits et une évaluation sensorielle de leur goût ont également permis d'estimer au champ leur maturité. Lorsque la chair est pâle,

opaque, peu sucrée, et âpre les fruits sont immatures tandis que lorsque la chair des fruits présente de la translucidité, un goût de fermentation, ils sont sur-mûrs. Dans les deux cas ils ont été éliminés de la sélection. Les fruits mûrs présentent des qualités organoleptiques très satisfaisantes, avec un parfum agréable et une chair jaune plus ou moins intense. Nos résultats sont cohérents avec ceux de la littérature (Soler. 1992) Néanmoins à maturité égale la chair des fruits est colorée différemment selon la taille des fruits, d'où l'importance d'une sélection homogène.

La mesure des teneurs en sucre des fruits diffère selon les variétés. Les variétés MD2 et Flh41 présentent des valeurs élevées de brix de 14,7° à 16,6°, et de 13,0° à 17,3° respectivement. Nous avons constaté que la majorité des fruits sélectionnés au champ présentaient une teneur en sucre plus élevée que la valeur seuil de 12° ce qui est le minimum requis pour une maturité commerciale (FAO, Codex Alimentarius. 2007). Les fruits présentant des valeurs de brix inférieures n'ont pas été sélectionnés.

La mesure de l'acidité libre titrable des fruits est la plus élevée pour les variétés SC et Flh41 de l'ordre de 11 et 13 meq. 100 ml⁻¹ respectivement ; où Flh41 présente une acidité libre titrable plus élevée que SC (Brat *et al.*, 2004). Le rapport sucre/acidité qui confère la qualité gustative des fruits mûrs est de l'ordre de 0,92 à 0,96 pour SC ; de 1,15 à 1,27 pour MD2 ; de 0,93 à 1,24 pour Flh41, et de 1,10 à 1,55 pour Flh53. Généralement les fruits mûrs peuvent présenter un ratio sucre/acidité de 0,9 à 1,3 (Soler. 1992).

L'ensemble de ces paramètres mesurés au champ et au laboratoire ont permis de sélectionner des fruits matures et homogènes pour la suite des travaux.

2.2 Intégrité membranaire : tests des dommages relatifs

L'intégrité membranaire de fruits frais (T_0) et de fruits sénescents (T_{20}) a été comparée pour les différentes variétés d'ananas. La méthode de Weerahewa et Adikaram (2005) a été modifiée en utilisant non pas un milieu simplement aqueux mais un milieu isotonique ajusté au brix du fruit avec du saccharose. La mesure des efflux d'électrolytes à partir des cellules permet de mesurer les « dommages relatifs aux membranes » (Vasquez-Tello *et al.*, 1990). D'après les résultats (Figure. 1) les efflux d'électrolytes sont plus élevés dans le cas des fruits sénescents (T_{20}) que dans celui des fruits frais (T_0). Ce phénomène pourrait participer au moins en partie à la translucidité des fruits qui apparaît pendant leur sénescence. De plus les efflux d'électrolytes sont plus importantes chez les fruits traités au froid (TPR) que chez les

fruits sénescents Il faut noter que ce n'est pas le cas de la variété résistante au BI, MD2 (Figure 1). D'après les résultats la variété MD2 présentant les efflux d'électrolytes les plus bas, possède donc un système membranaire plus stable au froid que celui des autres variétés.

Dans les cas des variétés sensibles au BI la comparaison en fin d'expérience (135 min), entre les efflux des témoins et ceux des fruits sénescents, montre dans tous les cas une stimulation des efflux induite par la sénescence de 24 %, 43 % et 46 % environ, respectivement pour les variétés SC, Flh41 et Flh53. Par ailleurs la comparaison entre les témoins et les fruits ayant subi le TPR montre de la même façon que le traitement TPR induit une augmentation des efflux de 39 %, 59 %, 67 % environ, respectivement pour les variétés SC, Flh41 et Flh53.

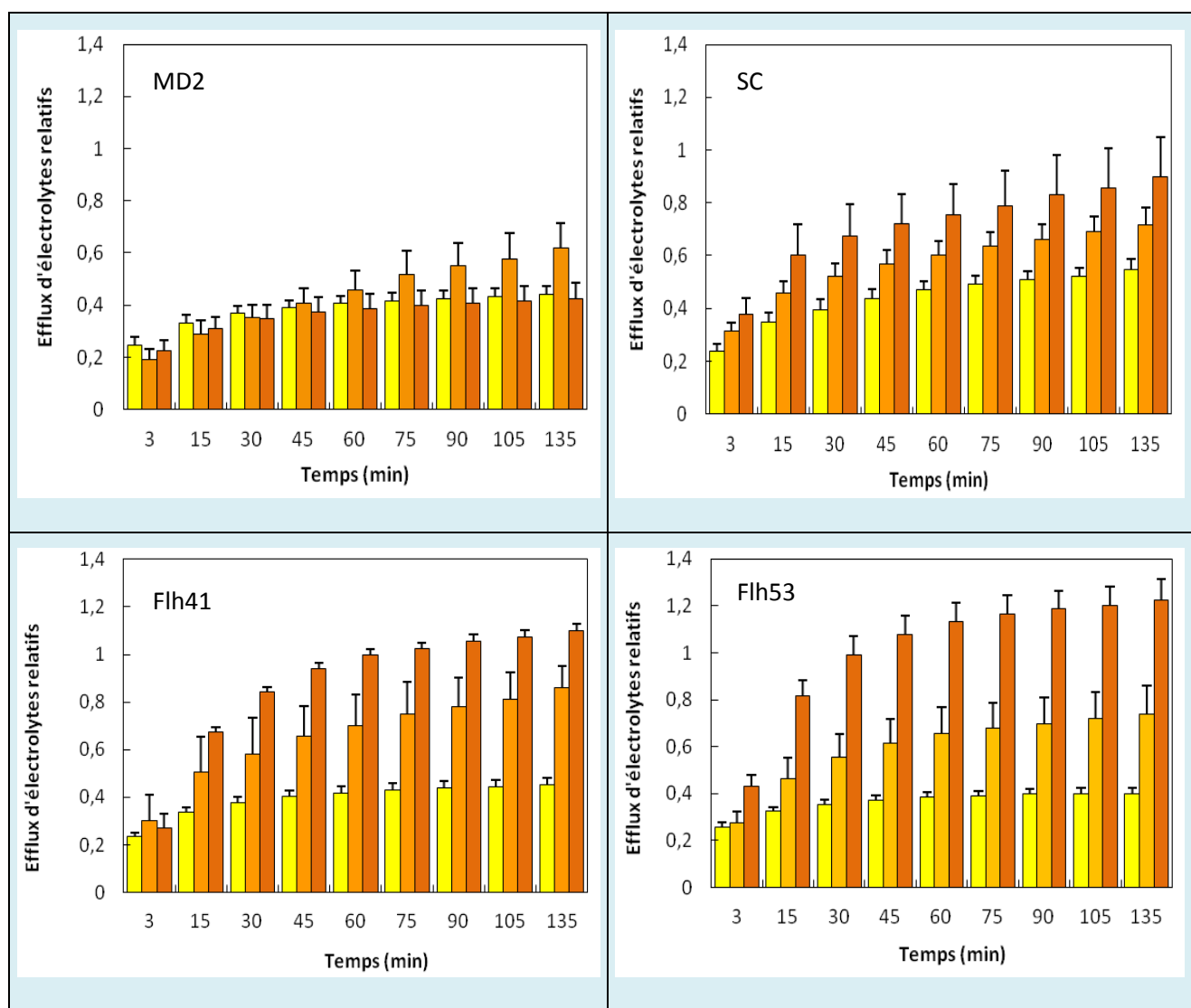


Figure 1 : Efflux d'électrolytes relatifs

■ T₀ : fruit frais dès récolte ; ■ T₂₀ : fruits sénescents de 20 jours à 25°C ; ■ TPR : fruits soumis 10 jours à 9°C puis 10 jours à 25°C.

Bien au contraire dans le cas de la variété résistante au BI, MD2, le fait notable est que les efflux d'électrolytes sont les mêmes chez les témoins et les lots traités au TPR et ceci, à tout moment de la cinétique. Seule la sénescence (20 jours à 25°C) induit une augmentation des efflux de 29 % environ ce qui est attendu dans le cas d'un fruit qui sénescence dès la cueillette. Le comportement de cette variété résistante au BI diffère clairement de celle des autres variétés qui elles, sont sensibles.

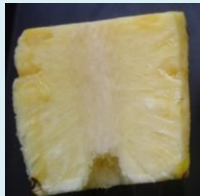


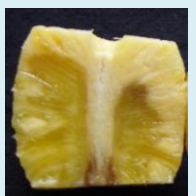




Enfin, le test « des dommages relatifs » mis au point au cours de ce travail se révèle fiable pour le classement des variétés de la plus résistante à la plus sensible au BI, avec environ 0,4 ; 0,9 ; 1,1 et 1,2 respectivement pour les variétés MD2, SC, Flh41 et Flh53.

2.3 Symptômes induits par le traitement au froid

Un classement des variétés en 2 groupes distincts a pu être réalisé grâce à l'étude des symptômes liés aux BI, mais également par le test de résistance des membranes au froid en pos-récolte (TPR). Le **groupe 1** ne comporte qu'une seule variété : MD2. Celle-ci ne présente pas de symptômes de BI lors de son traitement au froid (Tableau 3). Ce résultat est en accord avec les travaux donnant cette variété comme tolérante aux nématodes et au BI (William et Fleisch. 1992). De plus les résultats obtenus lors du test d'efflux d'électrolytes montrent que MD2 se comporte de la même manière en condition témoin (T_0) et au froid en post-récolte (TPR), ce qui indique une capacité de résistance membranaire qui pourrait être au moins en partie impliquée dans la résistance au BI voire aux pathogènes comme indiqués précédemment. Le **groupe 2** comprend les variétés Flh41, Flh53 et SC. Elles présentent différents symptômes comme une translucidité et un brunissement de la chair des fruits, dont l'intensité et le développement sont variables (Tableau 3). Ces résultats confirment ceux de la littérature pour lesquels la variété Cayenne lisse (SC) est une variété modèle pour l'étude du BI. De plus ils mettent l'accent sur 2 nouvelles variétés Flh53 et Flh41 sensibles au BI. Nous avons observé que ces variétés présentent des symptômes dont l'intensité n'est pas toujours liée au nombre de jours de traitements (données non présentées). En effet, après traitement au froid dès 6 à 8 jours de retour des fruits à température ambiante, les symptômes de BI apparaissent déjà dans les différentes variétés d'ananas sensibles au BI. Or ces variétés présentent toutes d'importantes efflux d'électrolytes lorsque les fruits sont soumis au froid avec cependant une intensité qui diffère (Figure1). Ces résultats sont en accord avec d'autres résultats sur des variétés sensibles au BI comme Kew (groupe Cayenne lisse) et Mauritius

(Groupe Queen). En effet les fruits présentent des efflux d'électrolytes importantes au niveau des tissus bruns atteints par le BI (Weerahewa et Adikaram. 2005). Les variétés hybrides Flh41 et Flh53 présentent une variété de symptômes de BI décrits dans la littérature dans le cas de la variété SC (Teisson et Combres. 1979). Flh41 présente après de 20 jours d'expérimentation (TPR) une translucidité marquée de la chair avec peu de brunissement, tandis que la variété Flh53 présente à la fois une forte translucidité et un brunissement de la chair du fruit (Tableau 3).

Tableau 2 : Symptômes de BI des 4 variétés : MD2, C Flh53 et Flh41 soumis au traitement au froid en post-récolte (TPR).

Nom	MD2	SC	Flh53	Flh41
Illustration des symptômes de BI après traitement au froid en post-récolte (TPR)				
Symptômes	Absence	Brunissement intense	Brunissement et translucidité	Translucidité intense et faible brunissement
Synthèse Graphique des symptômes				

Conclusion

Au terme de cette étude, les paramètres comme le brix (minimum 12°), le ratio sucre/acidité, l'état des yeux, la couleur et le parfum des fruits sont pertinents pour réaliser une sélection homogène de fruits mûrs.

Deux contrôles : frais T_0 et sénescents T_{20} ont été testés. Le choix d'un fruit frais témoin apparaît indispensable puisque les fruits sénescents présentent une translucidité et des efflux d'électrolytes importants, phénomènes qui ne peuvent être comparés au BI, notamment pour la variété MD2. La sélection variétale d'ananas a permis de distinguer MD2, une variété résistante au BI et les variétés SC, Flh53 et Flh41 sensibles au BI ainsi que de découvrir différents symptômes de BI et une résistance variable des membranes. Dans cette optique le

test de dommages relatifs (Relative Injury Index, RII), a permis de classer les variétés en fonction de la « résistance » des membranes cellulaires à partir de tissus mis en présence de saccharose pendant 135 min. Le classement à l'issue de cette cinétique du plus résistant au plus sensible donne : MD2, SC, Flh41, Flh53. Ce classement est corrélé aux autres symptômes. Il en résulte que le test d'efflux d'électrolytes permettant d'évaluer la résistance des membranes cellulaires est pertinent dans le cas de l'ananas pour classer les variétés selon leur résistance aux contraintes abiotiques comme cela a été montré dans le cas de la sécheresse chez les Fabacées (Vasquez-Tello *et al.*, 1990).

CHAPITRE 2 :

**Article 1 : Polyphenol oxidase and Peroxidase
expression in Four Pineapple varieties (*Ananas
comosus* L.) after chilling injury**

Cette étude fait l'objet d'un article publié dans le « Journal of Agricultural and Food Chemistry » : *Raimbault, A.K., Marie-Alphonsine, P.A., Horry, J.P., Francois-Haugrin, M., Romuald, K., Soler, A. 2011. "Polyphenol Oxidases and Peroxidases Expression in Four Pineapple Varieties (Ananas comosus L.) after a Chilling Injury.", 59, 342-348.*

Le chapitre précédent a mis en lumière une différence de résistance/sensibilité des variétés MD2, Flh41, Flh53 et SC au brunissement interne (BI). La variété MD2 est résistante et n'est donc pas affectée par le BI tandis que les autres variétés sont sensibles et présentent différentes intensités de translucidité et de brunissement des tissus.

L'objectif de cette étude a été de déterminer si les enzymes responsables de l'oxydation des phénols comme la polyphénol oxydase (PPO) et la guaiacol peroxydase (POD), sont impliquées dans le développement des symptômes propres au BI chez différentes variétés d'ananas de sensibilité variable.

Les travaux ont porté sur les mesures des activités enzymatiques de la PPO et de la POD et ont été complétées par l'analyse des isoformes des deux enzymes.

Expérimentation

Différentes variétés d'ananas ont été utilisées : la variété MD2, résistante au BI et les variétés Flh41, Flh53 et Cayenne lisse, sensibles. Chaque variété a fait l'objet d'un traitement au froid en post-récolte (TPR) : 10 jours à 9°C puis 10 jours à 25°C. Ce traitement est nécessaire à l'exportation des fruits mais induit le BI. Les témoins correspondent à des fruits fraîchement cueillis (T_0).

Principaux résultats

L'activité de la PPO augmente significativement lorsque les fruits sont soumis au traitement TPR. Les fruits sensibles au BI, Flh41, Flh53 et Cayenne lisse (SC), présentent de fortes activités PPO, contrairement à la variété résistante MD2 qui présente une très faible activité et aucun symptôme de brunissement. Entre 1 et 6 isoformes ont été détectées pour la PPO pour les variétés sensibles au BI soumises (TPR). D'après les résultats, l'activité PPO et le nombre d'isoformes détectées dépendent des variétés.

L'activité de POD est inhibée par le TPR, et particulièrement chez la variété résistante MD2. D'après ces résultats, il semblerait que la POD soit peu ou pas impliquée dans le BI.

Conclusions

Les résultats montrent une stimulation de l'activité PPO chez les fruits atteints par le BI. Ils confirment que la PPO est responsable du brunissement des fruits. Jusqu'à présent 2 gènes codant la PPO sont connus : PINPPO1 et PINPPO2. Ainsi les isoformes de PPO détectés pourraient témoigner de l'existence d'autres gènes codant la PPO. Dans la mesure où ces isoformes apparaissent uniquement chez les variétés sensibles au BI, leur détection pourrait constituer une stratégie pour le criblage des variétés sensibles au BI, d'autant plus que chaque variété d'ananas étudiée présente un nombre différent d'isoformes. Ces travaux pourraient être transposés à de jeunes plantules d'ananas dans le cadre de programmes de sélection variétale précoce pour la résistance au BI.

Polyphenol Oxidase and Peroxidase Expression in Four Pineapple Varieties (*Ananas comosus* L.) after a Chilling Injury.

A.K. RAIMBAULT^(†), P.A. MARIE-ALPHONSINE^(†), J.P. HORRY^(‡), M. FRANCOIS-HAUGRIN^(†), K. ROMUALD^(†), A. SOLER^{(†)*}.

^(†)CIRAD, PERSYST, UR: Banana, Plantain and Pineapple cropping systems

Pôle de Recherche Agroenvironnementale de la Martinique, 97285, Le Lamentin, Martinique (FWI).

^(‡)CIRAD, BIOS, UR : Genetic improvement of vegetatively propagated crops,

Avenue Agropolis, TA A-75/02, Bât.2, Bur. 29, 34398 Montpellier Cedex 5 (France)

Author to whom correspondence should be addressed

Alain SOLER

Tel ++ (596) 596 42 30 92

Fax ++ (596) 596 42 30 01

Email alain.soler@cirad.fr

Abstract

Pineapple internal browning (IB) is a chilling injury that produces enzymatic browning associated with flesh translucency. Pineapple biodiversity allowed the investigation of how polyphenol oxidase (PPO) and peroxidase (POD) activities with their different isoforms are involved in the IB mechanism. Fruits of four varieties that expressed IB symptoms differently, Smooth Cayenne (SCay) and the hybrids MD2, Flhoran 41 (Flh 41), and Flhoran 53 (Flh 53), were stressed by cold. The susceptible varieties showed classical brown spots but different patterns of IB, whereas MD2 and controls showed no IB. Enzymatic activities were measured on fruit protein extracts and PPO and POD isoforms separated on mini gels (PhastSystem). Only PPO activity was significantly enhanced in the presence of IB. Up to 6 six PPO isoforms were identified in the susceptible varieties. PPO was barely detectable in the nonsusceptible variety MD2 and in controls. The number of PPO isoforms and the total PPO activity after chilling are varietal characteristics.

Keywords: Internal Browning, chilling injury, polyphenol oxidase, peroxidase, pineapple varieties

Introduction

Browning of the flesh in stressed or injured fruits and vegetables is a common symptom linked to polyphenol oxidase (PPO) or peroxidase (POD) activity (1). Quinone products resulting from phenol oxidation tend to polymerize into brown compounds that bind with amino acid groups of cellular proteins (2). Under normal cold-storage conditions, pineapples are maintained at a temperature of 8 °C. Pineapple internal browning (IB), also known as blackheart or endogenous brown spots, develops to a greater or lesser extent depending on the cold stress intensity undergone by the fruit. IB has also been shown to depend on the fruit susceptibility, which, in turn, depends on the maturity stage, the nutritional status, and the variety (3-5). IB was found to be inducible above the usual storage temperatures, but the higher the temperature, the fewer the symptoms (5).

Flesh translucency is a symptom associated with IB and other chilling injuries. At a temperature of < 8 °C, extensive translucency of the flesh was reported to start under the shell and spread throughout the fruit flesh, especially when the storage temperature was close to 0 °C (3, 5-7). At 8 °C, when IB is also induced, translucent spots were observed at a very early stage of IB but close to the heart of the fruit (3, 5, 6, 8). Finally, translucency of the flesh has also been reported when heat and irregular irrigation or rainfall occurred at the same time when the fruit was ripening on the plant. In this case, an excess supply of nitrogen to the plant was found to be an enhancing factor (9-11). Translucency of the flesh was thought to be the consequence of major cell disorganization resulting in leakage of cell contents and disappearance of intercellular spaces (7, 8, 10, 12).

PPO and POD are extensively distributed in plants. Their association with various physiological events has been widely evidenced, and their multiple physiological functions are not totally elucidated.

PODs, which exist in plant cell as soluble and membrane bound proteins, are involved in lignin biosynthesis either for normal development of the plant (13-14) or for plant defense through the reinforcement of cell walls under biotic stresses (16). Among other functions in plant defense, PODs participate to the synthesis of toxic compounds as quinones and in the regulation of H₂O₂ levels inside the cell and in the apoplastic area (17, 18). H₂O₂ may be produced with other reactive oxygen species (ROS) during plant defense (during a hypersensitive reaction, for example, leading to cell death), but H₂O₂ is also considered as one of the early signal molecules of which levels are fine-tuned through POD activities in plant systemic resistance (19). POD are involved plant growth regulation through hormone

regulation and particularly IAA and ethylene (20, 21). Finally, they are responsible for enzymatic browning in fruits and processed food.

PPOs exhibit also numerous physiological functions in plants. They are found in a variety of subcellular fractions and particularly chloroplast. They are physically separated from their phenolic substrates as these are found in vacuoles (22, 23). PPO are also involved in plant defense system through the biosynthesis of toxic quinones and a wide range of phytoalexins (16, 24). They may also reinforce the cell walls through the polymerisation of quinones forming insoluble melanin (16). Direct modification of proteins may result from PPO action, reducing their nutritive value for insect herbivores (25). PPO are also involved in developmental regulations as they generally are found in higher concentration in young leaves and immature fruits (24). Increase in PPO activity is not always linked to increased gene expression. In banana ripening or in spinach leaves, it is believed that increased activity of PPO is related to activation of pre-existing latent PPO (26, 27). Finally, the involvement of PPO in the oxidation of phenolic compounds leading to browning is its most familiar function (24).

Biotic and abiotic stresses such as chilling produce an oxidative burst in plant cells (28-30). The formation of ROS resulting from this oxidative burst is prevented by an antioxidant system. This system includes various low molecular mass antioxidants (ascorbic acid, glutathione, and tocopherols) and enzymes regenerating the reduced forms of the antioxidants. It includes also ROS-interacting enzymes such as SOD, peroxidases and catalases (31). PPO and POD are part of such a system in pineapple fruit when the evolution of enzymes of the antioxidant system could be measured after a heat stress and during senescence (11).

In previous studies on SCay and MD2 (an IB-resistant hybrid), it was suggested that the regulation of PPO genes plays a key role in the development of IB symptoms (3, 4). The same authors reported that new PPO enzymes were induced by cold stress in pineapples, whereas POD enzymes were not, even though POD have been found to be responsible for browning in other fruits (32, 33). Stewart et al. (34), described two distinct pineapple PPO cDNAs, designated PINPPO1 and PINPPO2, which show a high degree of homology to other plant PPO genes encoding polyphenol oxidase, but these authors also reported that, according to their data, more genes could be involved in IB. More recently, using a similar technique on SCay, Zhou et al. (6) reported that only two PPO were involved. Thus, it is not yet clear how many PPO and consequently how many genes are actually involved in IB and if this depends on the variety.

The focus of this study was on PPO and POD and their possible involvement in browning symptoms. We separated PPO and POD isoforms in four different pineapple varieties that showed different expression of IB symptoms, using a simple protein separation technique based on electrophoresis on mini-gels (PhastSystem) applied to fruit protein extracts of four varieties and hybrids of pineapple.

These results increased our understanding of the mechanisms involved in IB but will also help to develop simple tools for screening varieties to identify potential parents for hybridization and to rapidly evaluate new hybrids. The role of translucency and other cell disorders involved in the development of IB is also discussed.

Material and Methods

Fruit material. Four varieties, Smooth Cayenne (SCay), MD2, and two CIRAD hybrids Flhoran 41 (Flh 41) and Flhoran 53 (Flh 53), were grown at the CIRAD research station in Martinique under typical tropical climate (latitude 15 °N – longitude 62°W) on halloysite soils. Cultivation practices included liming (Ca^{2+} , Mg^{2+}) and foliar fertilizer applications (urea and potassium sulfate, $\text{K}_2\text{O}/\text{N} = 2.5$) and iron as chelate. At harvest, control fruits were immediately frozen after peeling, whereas chilled fruits were stored at 8 °C for 1 week and then an additional week at room temperature (24 °C) before peeling and freezing. Fruits were harvested fully ripe (meaning edible with fully developed flavor without fermentation). Pineapples are nonclimacteric fruits, comprising 100 – 120 individual fruitlets and showing a strong maturity gradient from bottom to top. In addition, the external coloration frequently does not reflect the actual stage of maturity of the flesh. These characteristics are rendering difficult the use of an objective index of maturity when a varietal comparison is made. It should be noted that MD2 fruits tend to become translucent when fully ripe. The same tendency is observed in Flh 41 when the fruits are slightly over-ripe, whereas in Flh 53 and SCay, only very over-ripe fruits become translucent (data not shown). Harvest stage was chosen for control fruits instead of fruits stored at 24 °C for the same period, for two reasons. First, it is difficult to evaluate the exact time of storage at 24 °C that would reflect an equivalent senescence development with the fruits stored at 8 °C then at 24 °C as cold delays senescence. Second, we observed in experiments on enzymatic activity evolutions during senescence that PPO and POD activities were not significantly different at harvest and after 10 – 12 days at 24 °C. Actually, they were very low in the case of PPO (data to be published).

IB Browning Scale. To characterize the expression of IB symptoms in different varieties, we used a simplified IB scale from 1 to 3: level 1, no symptoms at all; level 2, presence of small translucent spots turning brown along the core of the fruit at the base of the individual fruitlets but symptoms spread only along the fruit core; level 3, presence of symptoms spread more widely in the flesh from the core up to the middle of the fruitlets. An example is given with Chilled fruits of Flh 41 in **Figure 1**.

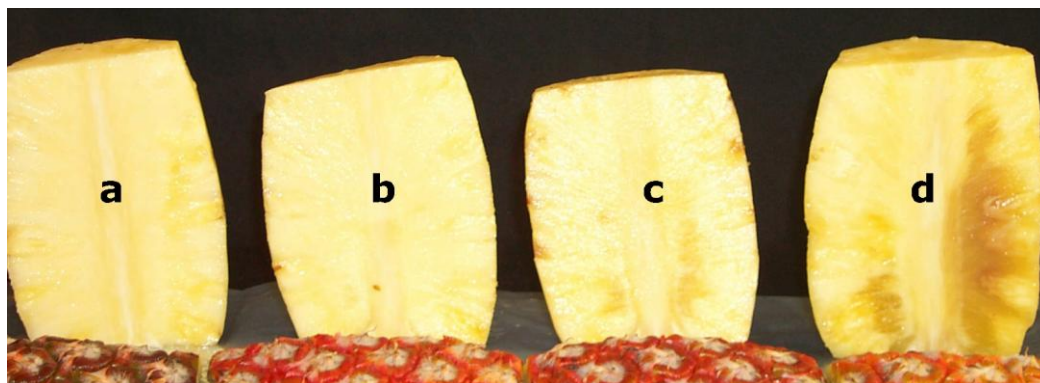


Figure 1. Internal browning Scale on Variety Flhoran 41: fruit a, harvest stage (note the green shell); fruit b, level 1, just after 10 days of cold storage at 8 °C (note the red skin showing the degreening on pineapple skin after harvest); fruit c, level 2, after a few days back at room temperature, translucent spots turning brown appear at the base of the fruitlet close to the heart of the fruit; fruit d, level 3, brown areas widely spread in the flesh of the fruit (note that symptoms are not necessarily homogeneously spread inside the fruit).

Protein Extraction. Proteins were extracted from 100 g of pulp taken from the area where IB symptoms appear in the fruit, close to the heart. The frozen fruit flesh was crushed in a Waring blender with, in the first step, 50 mL of chilled (4 °C) 0.2 M phosphate buffer, pH 6.8, with NaCl (0.75 g) to increase ionic force, and with polyvinylpyrrolidone (1 g) and ascorbic acid (0.88 g) and a protease inhibitor, 150 mg of phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF from SIGMA) as protective agents. In the second step, “juices” obtained in the first step were filtered on muslin and the solid residues again extracted with 20 mL of the same cold buffer and filtered once more. The combined filtrates were centrifuged for 25 min at 20 000 g and the solid residues discarded. Soluble proteins were precipitated with ammonium sulfate. The protein fractions precipitated between 30 and 90 % of saturation were used for analysis following two dialyses on a membrane (30 kDa) in an Amicon cell under nitrogen pressure (1 bar).

Proteins were analyzed using the technique developed by Bradford (35).

Enzymatic activities. Three different fruits per variety and per stage of observation at 24 °C were used as replicates and differences between control and chilled fruits were evaluated independently for each variety.

Statistical analysis was performed by simple ANOVA.

PPO activity was measured in a 0.2 M phosphate buffer (pH 6.8), with pyrocatechol (50 mM) as substrate; the reaction was initiated with 0.2 mL of protein extract (200 µg of protein), and then increases in absorbance at 420 nm were monitored for 4 minutes at 24 °C against a blank with buffer and substrate only and at the same concentration (1 unit of PPO = 0.1 dDO₄₂₀/min).

POD activity was measured in a 0.2 M citrate buffer (pH 5), with 2-methoxyphenol (18 mM), commonly known as guaiacol, and H₂O₂ (2 mM) as substrates; the reaction was initiated with 0.2 mL of protein extract (20 µg of protein). Increases in absorbance at 470 nm were monitored for 2 min at 24 °C against blank with buffer and substrate only and at the same concentration, (1 unit of POD = 1 dDO₄₇₀/min). All results were expressed as specific activities, units/mg of protein (U/mg prot).

Enzyme characterization. We have already studied some characteristics of pineapple PPO and POD enzymes in a previous work (11). Few additional characteristics were obtained using different substrates for PPO (pyrocatechol, 4-methylcatechol and DL DOPA). Inhibitors were tested on both enzymes: tropolone (1mM), specific for PPO (36 – 39) and KCN (17 mM) for POD and PPO (40, 41). Heat inactivation was measured for both enzymes, after different times at 80 and 90 °C.

Protein separation on native PAGE. Proteins were separated using the PhastSystem by native PAGE electrophoresis on mini gels with a polyacrylamide gradient of 8 – 25%. As the objective of native PAGE was to detect isoforms and not to differentiate levels of activity between varieties, protein extracts were diluted (from 0.7 to 1.5 mg/mL, respectively, for POD and PPO) to obtain the best protein separations on the gels. Special combs designed for the PhastSystem were used to deposit about 2 µl of diluted protein samples on the gel. Electrophoretic conditions for 2 gels run at the same time were 250 Volts with 5 mA/gel, 3 W, and 15°C.

Gels staining. The staining of the mini-gels was obtained by dipping in buffered solutions with the appropriate substrate: respectively, 0.025 M Trizma maleate buffer at pH 7 with 40 mM pyrocatechol and 2 mM CuCl₂ and 0.2 M citrate buffer at pH 5 with 69 mM guaiacol and

2 mM H₂O₂. The proteins underwent 1 min of prefixation in the fixation solution (ethanol/acetic acid/H₂O, 20v: 5v: 75v) before actual coloration, to enable better definition on the gel by reducing protein diffusion, especially in the case of PPO, which needed a longer time for staining (from 1 to 3 h depending on the activity). After staining, the gels were fixed in the above-mentioned fixation solution and immediately observed and scanned.

Unless indicated in the text, fruits used to differentiate enzyme expression between varieties with separation on native PAGE were classified as either level 1 (control fruits) or level 3 in the IB scale described before.

Results and Discussion

IB symptoms. **Figure 1** shows what the symptoms looked like and how the scale for the IB symptoms was determined. The fruit for all the varieties showed no symptom at harvest and no symptom just after cold storage. Slight symptoms (small translucent and brown spots) started to develop after a few days back at room temperature (24°C) in the fruits of the susceptible varieties and then spread widely into the flesh. At the same time, **Figure 1** shows how the degreening process occurred in the skin of the fruits after harvest. In the case of Flh 41, a red variety when fully ripe, the breakdown of the chlorophyll allowed the anthocyanins to appear, giving the red color to these fruits as shown in one of our previous works on this variety (42).

The first symptoms actually observed were small translucent spots at the base of the fruitlets before the brown spots developed. Similar observations were reported by Zhou et al. (6) and Weerahewa et al. (8). Furthermore, in Flh 41, translucency developed more quickly and more markedly than brown spots, suggesting that other cell disorders occur before full expression of PPO. This is consistent with the observation that over-ripe and translucent fruits, other common pineapple diseases due to hydric and heat stresses (11, 7), hardly develop browning symptoms, even those due to black spot resulting from *Penicillium/Fusarium* infestation (43). It has been suggested that as the air in intercellular spaces disappears, giving the translucent aspect to the flesh, the level of oxygen required for enzymatic browning is reduced (9).

In this experiment, we also observed a strong increase in electrolyte leakage from the flesh of chilled fruit for the IB-susceptible varieties but no increase for the MD2, the only resistant

variety (in press). This suggests that the reduction of membrane integrity in chilled fruit of susceptible varieties is part of the whole mechanism leading to IB symptoms.

Varietal susceptibility to chilling. IB symptoms were induced in all varieties except MD2. The three susceptible varieties (Flh 53, SCay, and Flh 41) showed slightly different patterns of IB. The very initial symptoms were similar in the three varieties, with small translucent spots appearing at the base of the fruitlets near the fruit core (6, 7, 44, 45). Next, the classic brown color appeared close to the fruit heart, especially in Flh 53, which showed the strongest symptoms. The same brown spots were observed in SCay, but the color was not as strong as it was for Flh 53. Flh 41 showed consistently brown spots (but they were not as dark as brown spots in other susceptible varieties) with widespread translucency of the flesh (**Figure 1**). No IB induction at all could be observed in MD2.

In this experiment, we were unable to consistently obtain the same intensity of IB symptoms in the different replicates with susceptible varieties. The main reason for these differences was the usual difficulty in determining similar stages of maturity in nonclimacteric fruits such as pineapples and moreover in different pineapples varieties. The second reason was probably the fertilizer ratio K_2O/N (2.5:1), which is not particularly favorable for the development of IB, as the high level of potash with the fertilizer applications increases the acidity and particularly the ascorbic acid content of the flesh (5). As a natural antioxidant in fruits, ascorbic acid may decrease IB symptoms or at least delay their appearance by reducing quinones produced by the PPO back to phenols (5, 11).

Table 1. Ascorbic Acid Content at Harvest in Different Pineapple Varieties

Pineapple variety	ascorbic acid content ^a (mg/100mL)
Smooth Cayenne (SCay)	11.7 ±1,6 ^a
Hybrid Flhoran 53 (Flh 53)	21.2 ±4,0 ^c
Hybrid Flhoran 41(Flh 41)	19.6 ±6,5 ^c
MD2	45.2 ±14,9 ^d

^aMeans of 25 fruits; all values significantly different (p=0.05) except for the 2 hybrids Flh 53 and Flh 41.

The ascorbic acid contents of the fruits of the four varieties differed considerably in our growth conditions, the highest being observed in MD2. Then ascorbic acid contents were

higher in Flh 41 and Flh 53 than in SCay (**Table 1**). In other experiments, strong IB symptoms could also be induced in the susceptible Queen variety even though this variety is normally rich in ascorbic acid (46). Moreover, Youryon et al. (47) showed that in this variety ascorbic acid remains high during cold storage even in areas of the flesh showing IB symptoms.

These observations suggest that there is no direct relationship between the ascorbic acid content of a variety and its susceptibility to IB even if a higher content in ascorbic acid may delay the appearance of the symptoms.

Enzyme Characterization. In a previous study (11), we presented different characteristics of several enzymes related to stress and senescence protection in pineapple fruit including PPO and POD. In the present work, we added some additional data for pineapple PPO and POD.

First, the PPO activity was stronger using pyrocatechol as substrate than 4-methylcatechol and DL DOPA (for example, with pyrocatechol, 18.0 U/mg prot; with 4-methylcatechol, 1.67 U/mg prot and with DL DOPA, 1.0 U/mg prot on a protein extract of Flh 53). Second, we observed on the same protein extract of Flh 53 that the inhibition by tropolone, a specific inhibitor of PPO, was very effective only on the PPO activity (0.8 and 58.1 U/mg prot, respectively, for PPO and POD). Potassium cyanide almost completely inhibited both activities. Third, PPO was not affected after 10 min at 80 °C, exhibiting a much stronger heat tolerance than POD, the activity of which was reduced by 50% after only 3 min. Both enzymes were almost completely destroyed after a brief period of time at 90 °C. It is known that depending on plant species and varieties, PPO may exhibit a large scale of heat tolerance but usually POD exhibit a much stronger heat tolerance than PPO (24).

PPO and POD Activities. PPO activity was very low in control fruits and high in chilled fruits except in MD2, the nonsusceptible variety. PPO activity was correlated with the variety susceptibility to IB (**Figure 2**) and that is consistent with previous studies in which two varieties of different susceptibilities were compared (3, 6, 34). Flh 53 showed the highest increase in PPO activity, followed by SCay then Flh 41 (differences between control and chilled fruits were highly significant, $p < 0.01$), whereas in MD2 there were no significant differences between chilled fruit and controls.

Conversely, POD activity was lower in chilled fruits compared to control fruits for the four varieties, particularly for MD2 (all differences between control and chilled fruits were highly significant, $p < 0.01$). Among the susceptible varieties, POD activities decreased when PPO activity increased (**Figure 2**). This is the first time this behaviour has been reported in pineapple, and it seems very different from what is observed in other fruits and vegetables such as melon and cucumber (32, 33, 48). POD activity (guaiacol) was much higher than PPO activity (pyrocatechol) even in chilled fruit, which is consistent with the data of Teisson (5).

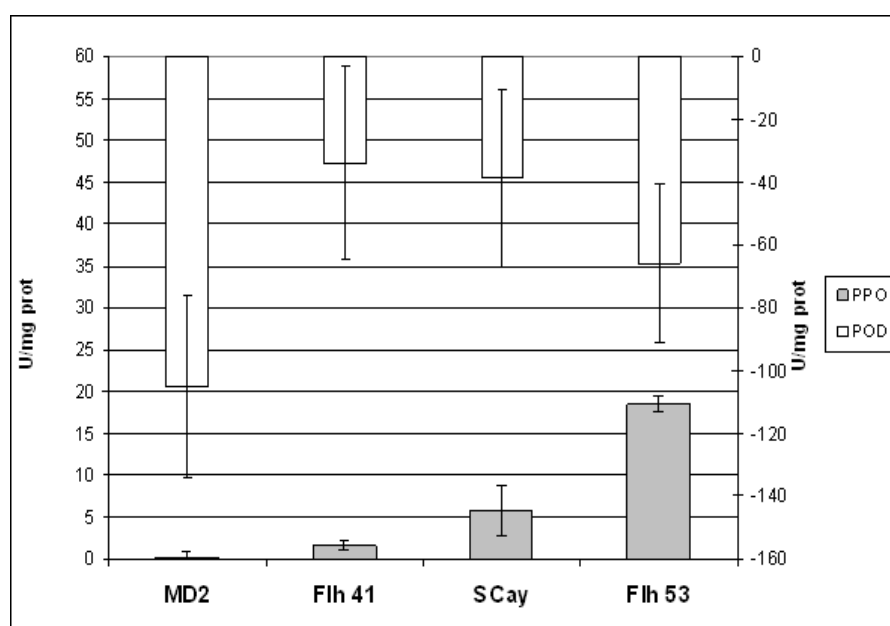


Figure 2. PPO and POD specific activity differences between chilled fruits and controls for the four varieties (PPO, gray bars with scale; POD, white bars). Three different fruits were used as replicates. PPO activities were measured in a 0.2 M phosphate buffer (pH6.8), with 50 mM pyrocatechol, the reaction being initiated with 0.2 mL of protein extract (200 μ g of protein), and then increases of absorbance at 420 nm were monitored for 4 min. POD activities were measured in 0.2 M citrate buffer (pH=5), with 18 mM guaiacol and 2 mM H_2O_2 as substrates and the reaction being initiated with 0.2 mL of protein extract (20 μ g of protein). Absorbance increases at 470 nm were monitored for 2 min. One unit of PPO activity = 0,1 dDO₄₂₀/min), one unit of POD activity = 1 dDO₄₇₀/min (all differences between control and chilled fruits were highly significant $p < 0.01$, except for MD2 PPO.)

In other fruits and vegetables or plant leaves, POD activity is normally enhanced by stress, as it is part of the plant defense system against stresses (49, 50). The POD activity actually increases in pineapple during ripening before decreasing again when the fruit is over-ripe (11). The significance of the decrease in POD activity in our experiment may be related to fruit senescence resulting from a long storage needed to observe the development of IB symptoms. Actually, we found that POD activities, as well as that of other another peroxidase,

ascorbate peroxidase, were enhanced during the cold storage before decreasing strongly after the return to room temperature (data to be published). This early increase during cold storage could be similar to the one observed for other fruits as mentioned before.

These results suggest that the mechanisms responsible for the evolutions of PPO and POD activities during the storage are different. The PPO increase was observed only after the fruits are back to room temperature, suggesting a *de novo* synthesis; meanwhile, the quick increase of POD during the cold storage suggests a mobilization of pre-existing enzymes. Then POD activities normally decreased with senescence, giving the strong differences between control and chilled fruits shown in **Figure 2**.

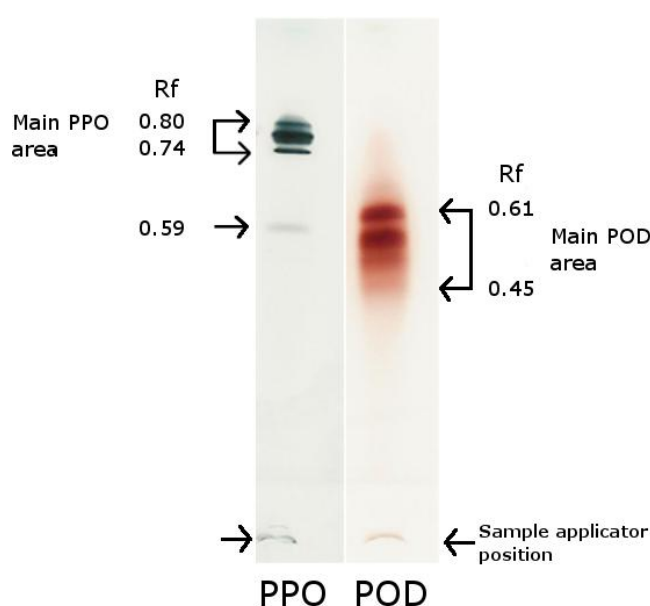


Figure 3. PPO and POD isoforms differentiation on Micro Native PAGE: Flhoran 53 protein extract. Separation was on native PAGE 8-25% gradient gel. PPO coloration: 0.025 M Trizma maleate buffer at pH 6.4 with 40 mM pyrocatechol and 2 mM CuCl_2 . POD coloration: 0.2 M citrate buffer, pH 5, with 69 mM guaiacol and 2 mM H_2O_2 .

PPO and POD Isoform Differentiation on Mini Native PAGE (Figure 3). Electrophoretic separation revealed several PPO isoforms but only in chilled fruits that developed IB symptoms. Many POD isoforms were detected in both chilled and nonchilled fruits of the four varieties. The specific colorations for PPO (with pyrocatechol as substrate) and for POD (with guaiacol and H_2O_2 as substrates) allowed us to distinguish a main area for PPO isoforms ($0.74 < R_f < 0.80$) and a main area for POD isoforms ($0.45 < R_f < 0.61$) (**Figure 3**).

PPO isoforms (Figure 4). The number of PPO isoforms detected was clearly related to the susceptibility of the varieties and the presence of IB symptoms. No PPO isoforms could be detected either in control fruit (all varieties) or in chilled MD2 fruits. One isoform at $R_f = 0.78$

was common for the three susceptible varieties. One isoform at $R_f = 0.80$ was common only for SCay and Flh 53. Finally, two isoforms ($R_f = 0.74$ and 0.76) were detected only in Flh 53 extracts, resulting in four isoforms for Flh 53, two isoforms for SCay, and one isoform in Flh 41 in the main PPO area mentioned above.

In addition, two minor isoforms were also detected for SCay and Flh 53 at $R_f = 0.55$ and 0.59 . It could be either PPO isoform or POD exhibiting PPO activity as suggested by Teisson (51). This possibility has also been mentioned in other plant such as *Dioscorea esculenta* (52), but these two PPO isoforms, although they were detected in the main POD area on the gels, did not show POD activity when guaiacol was used for staining, suggesting that they are true PPOs. **Figure 3** shows clearly that the PPO isoforms at $R_f = 0.59$, did not exhibit POD activity.

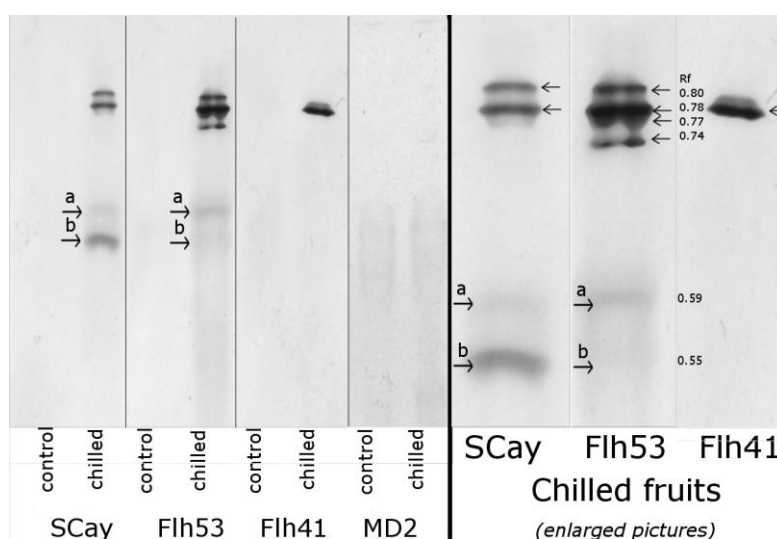


Figure 4. Electrophoretic separation of PPO in different pineapple varieties with or without IB symptoms. Flh 41 = Flhoran 41, Flh 53 = Flhoran 53, SCay= Smooth Cayenne. Separation was on native PAGE 8 - 25% gradient gel. PPO coloration: 0.025 M Trizma maleate buffer, at pH 6.4 with 40 mM pyrocatechol and 2mM CuCl_2 . R_f PPO: Flh 41 (one band): 0.78; Flh 53 (four bands 0.80, 0.78, 0.77 and 0.74, plus two 2 bands, a and b, in POD area R_f 0.55 and 0.59); SCay (two bands, 0.80, 0.78 plus two bands, a and b, in POD area R_f 0.55 and 0.59); MD2, no PPO detected.

The use of tropolone in the staining bath did not bring determinant additional information because this inhibitor is a slow-binding inhibitor (37). Tropolone only reduced the intensity of the bands on the gels without modifying the apparent number of PPO isoforms. KCN, on the other hand, blocked totally the appearance of both PPO and POD isoforms (data not shown).

In conclusion, there were clear correlations between the variety susceptibility, the PPO activity, and the number of PPO isoforms.

POD isoforms (Figure 5). Up to seven POD isoforms could be detected including two isoforms in the cationic protein area. The number of isoforms for POD was higher than for

PPO. Using NaCl in the extraction buffer to increase its ionic strength, we have not only extracted soluble POD but also ionically bound ones. A high number of POD isoforms with cationic and anionic isoforms is also observed in other plants under stress (52).

Some differences appeared between chilled fruits and control fruits for SCay and Flh 53 but not for Flh 41 and MD2. For both SCay and Flh 53, the POD isoform at $R_f = 0.61$ is higher in chilled fruit than in control; conversely, those at $R_f = 0.54$ and 0.47 are lighter, indicating a link between POD expression and IB or, at least, cold stress. These results are consistent with those of Weerahewa et al. (8), who managed to separate two soluble PODs in control and three in fruit showing IB.

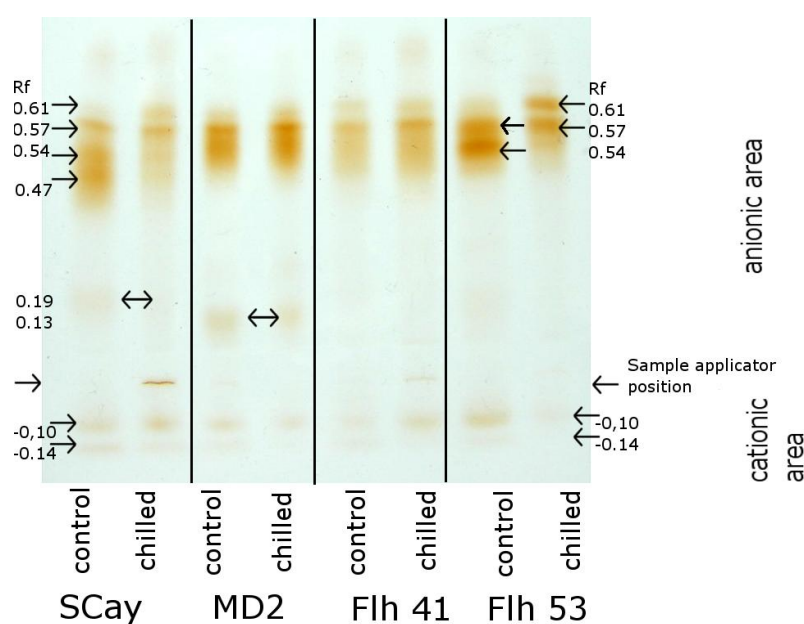


Figure 5. Electrophoretic separation of POD in different pineapple varieties with or without IB symptoms. Flh 41 = Flhoran 41, Flh 53=Flhoran 53, SCay=Smooth Cayenne. For each variety, control is on the left, chilled fruit on the right. Separation on native PAGE 8% to 25% gradient gel POD coloration: 0.2 M citrate buffer, pH 5, with 69 mM guaiacol and 2 mM H_2O_2 . Cationic area includes proteins showing POD activity and migrating towards the cathode. Anionic area includes proteins showing POD activity and migrating towards the anode.

Cell membrane is considered to be the major target of chilling injury in plants (50). Gaspar (49) proposed an interpretative model for plant response to stresses involving a primary step with different reactive oxygen species generated by membrane depolarization, which in turn initiated lipid peroxidation. The degradation of the membrane allows leakage of cellular solutes such as phenolic compounds, ascorbic acid, and K^+ . Subsequent steps, including secretion of basic peroxidases into the free space, lead to protein synthesis such as Phenylalanine ammonia lyase (PAL) and acidic POD and result in a cell membrane rigidification in response to the stress.

Our own data, as mentioned before, and those of another study (8) showed that an increase in leakage of solutes can be measured in translucency associated with IB. We also observed such a leakage with translucency associated with a heat stress during a rainy period, indicating a degradation of the cell membrane (11). In the same study, we found that different enzymes involved in the control of oxidative stresses showed a strong increase. We hypothesized that it was the result of a plant reaction to protect the cells from the oxidative stress generated by the initial abiotic stress and that it was aimed at slowing cell degradation. The enzymatic systems included PPO, POD, NADH quinone reductase, SOD, and glutathione reductase, which are known to be part of the plant defense system (16, 17). At the same time, many acid hydrolases responsible for cell wall degradation showed a significant increase in the late stage of fruit senescence. It would be of interest to determine if similar systems are involved in the translucency of the flesh resulting from a chilling stress instead of a heat stress.

Finally, the use of native PAGE on mini-gels may be a simple and useful tool for a varietal screening of pineapple susceptibility to IB. The incidence and severity of the symptoms after cold storage are related to the increases of PPO activity and of the number of PPO isoforms involved, which are also clearly varietal components.

The early increase in POD activities at the beginning of the cold storage was followed by a strong decrease after return to room temperature; meanwhile, the increase of PPO activities observed only after return to room temperature suggests that the mechanisms involving PPO and POD in the cold stress in pineapple result from a *de novo* synthesis for PPO but not for POD.

As translucency appears before browning, and IB symptoms are limited in very translucent pineapples (due either to chilling or to over-ripening), other cell disorders may be the primary causes of chilling symptoms in pineapple. Among these primary causes, a decrease in cell membrane integrity may be responsible for making phenolic substrates available to PPO and POD enzymes.

Two points should now be investigated to better explain the physiological mechanisms involved in pineapple IB. The first is to verify if the number of PPO isoforms reflects the activation of the number of PPO genes actually involved in pineapple IB, their regulation, and their relative implication in the severity of the symptoms. The second is to better identify the primary disorders involved in the chilling injury and the varietal susceptibility to them. This should provide additional tools not only for the evaluation of varietal resistance to IB but also

to better understand the pineapple response to different biotic and abiotic stresses in pineapple.

Abbreviations used

ANOVA, analysis of variance; cDNA, complementary deoxyribonucleic acid; CIRAD, Centre International de Recherche en Agronomie pour le Développement; DL DOPA, 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-DL-alanine; Flh 41, variety Flhoran 41; Flh 53, variety Flhoran 53; IB, internal browning; MD2, variety MD2; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; PAL, phenylalanine ammonia-lyase; PMSF, phenylmethanesulfonyl fluoride; POD, peroxidase; PPO, polyphenol oxidase; ROS, reactive oxygen species; SCay, variety Smooth Cayenne; SOD, superoxide dismutase.

Literature cited

1. Vaughan, K.C.; Lax, A.R.; Duke, S.O. Polyphenoloxidase : the chloroplast oxidase with no established function. *Physiol. Plant.* **1988**, *72*, 659-665.
2. Mayer, A.M. Polyphenoloxidase and peroxidase in plants – Recent progress. *Phytochemistry*. **1987**, *26*, 11-20.
3. Stewart, R.J.; Sawyer, J.B.; Robinson, S.P. Blackheart development following chilling in fruit of susceptible and resistant pineapple cultivar. *Aust. J. Exp. Agric.* **2002**, *42*, 195-199.
4. Zhou, Y.; Dahler M.; Underhill, J.R.; Ron Wills, B.H. Enzymes associated with blackheart development in pineapple fruit. *Food Chemistry*. **2002**, *80*, 565-572
5. Teisson, C.I.; Combres, J.C.; Martin-Prevel, P.; Marchal, J. Internal browning of pineapple: III) symptoms, IV) biochemical approach. *Fruits*. **1979**, *34*, 315-338.
6. Zhou, Y.; O'Hare, T.J.; Jobin-Décor, M., Underhill, S.J.R.; Wills, R.B.H.; Graham, M.W. Transcriptional regulation of a pineapple polyphenol oxidase gene and its relationship to blackheart. *Plant Biotechnol. J.* **2003**, *1*, 463.
7. Soler, A. Pineapple : Quality criteria. Eds. CIRAD - COLEACP, Paris-France. **1992**. p 48.
8. Weerahewa D.; Adikaram N.K.B. Some biochemical factors underlying the differential susceptibility of two pineapple cultivars to internal browning disorder. *Cey.J.Sci. (Bio. Sci.)*, **2005**, *34*, 7-20.
9. Py, C.; Lacoëuilhe, J.J.; Teisson, C. The Pineapple Cultivation and Uses. Eds. G.P. Maisonneuve et Larose, Paris. **1984**, p 568.
10. Soler, A. Déviation de la maturation chez l'ananas : le jaune ou translucidité. I. Caractéristiques physiques et chimiques du fruit translucide. *Fruits*. **1994**, *49*, 5-15.
11. Soler, A. Déviation de la maturation chez l'ananas : le jaune ou translucidité. II. Caractérisation enzymatique du fruit translucide. *Fruits*. **1994**, *49*, 83-91.
12. Nilprapuck P.; Pradishtakarn N; Authanitee F.; Keejban P. Effect of exogenous methyl jasmonate on chilling injury and quality of pineapple (*Ananas comosus* L.) cv. Pattavia. *Silpakorn U. Science & Techn. J.* **2008**, *2*, 33-42.

13. Gaspar, T.; Penel, C.L.; Hagage, D.; Grappin H. Peroxidases in plant growth, differentiation and developmental processes. In: Biochemical, Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases, H. Grappin, C. Penel, T. Gaspar, Eds.; University de Geneve. **1991**, 249-280.
14. Gaspar, T.H.; Penel, C.L.; Thorpe, T.; Grappin, H. Chemistry and biochemistry of peroxidases. In Peroxidases, A survey of their biochemical and physiological roles in higher plants; Gaspar, T.H.; Penel, C.L.; Thorpe, T.; Grappin, H.,Eds.; University of Geneva. **1982**, 10-60.
15. Ravindra, N., & Van-Huystee, R. Characterization of peroxidase in plant cells. *Plant Physiol.* **1984**, 75, 956-958.
16. Benhamou, N. La résistance chez les plantes ; Tec & Doc Lavoisier, Eds.; **2009**, p 352.
17. Benhamou, N.; Picard K. La résistance induite: une nouvelle stratégie de défense des plantes contre les agents pathogènes. *Phytoprotection.* **1999**, 80, 137-168.
18. Appel, K.; Hirt, H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative Stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2004**, 55, 373-399.
19. Parent, C.; Capelli, N.; Dat, J. Formes réactives de l'oxygène, stress et mort cellulaire chez les plantes. *C. R. Biologies.* **2008**, 331, 255-261.
20. Goldberg, R.; Imberty, A.; Liberman, M.; Prat, R. Relationships between peroxidatic activities and cell wall plasticity. In "Molecular and physiological aspects of plant peroxidases"; Greppin, H., Penel, C., Gaspar, T., Eds.; University of Geneva. **1986**, 209-219.
21. Brownleader, M.; Ahmed, N.; Trevan, M.; Chaplin, M.; Prakash, M. Purification and partial characterization of tomato extension peroxidase. *Plant Physiol.* 1995, 109, 1115-1123.
22. Vaughn, K.C.; Duke, S.O. Function of polyphenol oxidase in higher plants. *Physiol. Plant.* **1984**, 60, 106-112.
23. Macheix, J.; Fleuriot, A.; Billot, J. Phenolic compounds in fruit processing. In Fruit phenolics; Macheix, J.; Fleuriot, A.; Billot, J., Eds.; CRC Press, Boca Raton, Florida, **1990**, 239-312.

24. Yoruk, R.; Marshall, M.R. Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review. *J. Food Biochem.* **2003**, *27*, 361-422.
25. Felton, G.W.; Donato, K.K.; Broadway, R.M.; Duffey, S.S. Impact of oxidized plant phenolics on the nutritional quality of dietary protein to a noctuid herbivore, *Spodopreria exigua*. *J. Insect Physiol.* **1992**, *38*, 277-285.
26. Gooding, P.S.; Bird, C.; Robinson, S.P. Molecular cloning and characterization of banana fruit polyphenol oxidase. *Planta.* **2001**, *213*, 748-757.
27. Lieberei, R.; Biehl, B.; Voigt, J. Serological studies on phenolase from spinach leaves. *Phytochemistry.* **1981**, *20*, 2109-2116.
28. Torres, M.A.; Dangl, J.L. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2005**, *8*, 397-403.
29. Bartosz, G. Oxidative stress in plants. *Acta Physiol. Plant.* **1997**, *19*, 47-64.
30. Imahori, Y.; Takemura, M.; Bai J. Chilling-induced oxidative stress and antioxidant responses in mume (*Prunus mume*) fruit during low temperature storage. *Postharvest Biol. Technol.* **2008**, 4954-4960.
31. Costa, P.H.; Dias de Azevedo Neto, A.; Bezerra, M.A.; Prisco, J.T.; Gomes-Filho, E. Antioxidant-enzymatic system of two sorghum genotypes differing in salt tolerance. *Braz. J. Plant Physiol.* **2005**, *17*, 353-361.
32. Chisari M.; Barbagallo R.; Spagna G. Characterization of polyphenol oxidase and peroxidase in browning of fresh-cut melon. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 132-138.
33. Chisari M.; Barbagallo R.; Spagna G. Characterization of polyphenol oxidase and peroxidase and influence on browning of cold stored strawberry fruit. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 3469-3476.
34. Stewart, R.J.; Sawyer, J.B.; Buchely, C.S.; Robinson S.P. Polyphenol oxidase is induced by chilling and wounding in pineapple. *Aust. J. Plant Physiol.* **2001**, *28*, 181-191.
35. Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248 -254

-
36. Dogan S.; Turan Y.; Ertürk, H.; Arslan, O. Characterization and purification of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.). *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 776–785
37. Espin, J.C.; Wichers, H.J. Slow-binding inhibition of mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase isoforms by tropolone. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 2638–2644.
38. Valero, E.; Garcia-Moreno, M.; Varon, R.; Garcia-Carmona, F. Time-dependent inhibition of grape polyphenol oxidase by tropolone. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39*, 1043–1046.
39. Kahn, V.; Andrawis, A. Inhibition of mushroom tyrosinase by tropolone. *Phytochemistry*. **1985**, *24*, 905–908.
40. Yang, C.P.; Fujita, S.; Ashrafuzzaman, M.D.; Nakamura, N.; Hayashi, N. Purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum* L.) pulp. *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, *48*, 2732–2735.
41. Anosikea, E.O.; Ayaebene, A.O. Purification and some properties of polyphenol oxidase from the yam tubers, *Dioscorea bulbifera*. *Phytochemistry*. **1981**, *20*, 2625–2628.
42. Brat P.; Nguyen Thi Hoang L.; Soler, A.; Reynes M.; Brillouet, J.M. Physicochemical characterization of a new pineapple hybrid (FLHORAN41 Cv.). *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 6170–6177.
43. Guerout, R. Les taches noires de l'ananas. *Fruits*. **1974**, *29*, 489–499.
44. Paull, R. E.; Rohrbach, K. G. Symptom development of chilling injury in pineapple fruit (*Ananas comosus*). *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **1985**, *110*, 100–105.
45. Smith, L. G. Cause and development of blackheart in pineapples. *Trop. Agric.* **1983**, *60*, 31–35.
46. Van Lelyveld, L. J.; Visser, G. J.; Swarts, D. H. The effect of various storage temperatures on peroxidase activity and protein PAGE gel electrophoresis in 'Queen' pineapple fruit. *J. Hortic. Sci.* **1991**, *66*, 629–634.
47. Youryon P.; Wongs-Aree C.; Mc Glasson W.B.; Glahan S.; Kanlayanarat S. Internal browning occurrences of 'Queen' pineapple under various low temperatures. *Proc. EURASIA*

Sym. On Quality Management in postharvest systems, ISHS; Kanlayanarat S. et al., Eds.; **2008**. *Acta Hort.* 807, 555-560.

48. Lee D. H.; Lee C.B. Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays. *Plant Sci.* **2000**, 159, 75-85.

49. Gaspar, T.H.; Penel, C.; Greppin H.A. A two-step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development. *Physiol. Plant.* **1985**, 64, 418-423.

50. Levitt, J. *Responses of Plants to Environmental Stresses*, Vols. 1 and 2; T.T. Kozlowski, Ed.; Academic Press, New York. **1980**.

51. Okpuzor, J.; Omidiji, O. Peroxidase-polyphenol oxidase association in *Dioscorea esculenta*. *Z. Naturforsch.* **1998**, 11, 57-60.

52. Mohammadi, M.; Kazemi, H. Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. *Plant Sci.* **2002**, 162, 491-498.

CHAPITRE 3: articles 2 et 3

**Expression de gènes et activités des enzymes du
catabolisme protéique**

CHAPITRE 3: article 2

Postharvest chilling treatment induces distinct expression in fruit bromelain and cystatin in two pineapple (*Ananas comosus* (L) Merr.) varieties differing in their susceptibility to blackheart physiopathy

Cette étude fait l'objet d'un article en cours de soumission : *Raimbault, A.K, Zuily-Fodil Y., Soler, A., Mora, P., Cruz de Carvalho, M.H. "Postharvest chilling treatment induces distinct expression in fruit bromelain and cystatin in two pineapple (*Ananas comosus* (L) Merr.) varieties differing in their susceptibility to blackheart physiopathy".*

Les chapitres précédents ont montré que des efflux d'électrolytes membranaires, et une activité enzymatique très élevée de la PPO sont associés à la sensibilité des fruits au brunissement interne (BI). Cette enzyme est responsable de la transformation des phénols en quinones, dont la polymérisation donne une couleur brunâtre plus ou moins intense à la chair des fruits. Or ceci implique une mise en contact entre le substrat phénolique vacuolaire et l'enzyme PPO, qui ne peut être réalisée que dans le cas d'une perte de l'intégrité des membranes cellulaires. Celle-ci pourrait en partie être liée à l'action d'acylhydrolases et d'endoprotéases comme cela a été montré en réponse au déficit hydrique.

L'objectif du travail a donc été de déterminer dans quelle mesure la broméline de fruit, endoprotéase à cystéine la plus abondante dans la chair des fruits d'ananas, et la cystatine, son inhibiteur naturel, sont impliqués dans les processus conduisant au BI chez l'ananas. Les travaux ont d'abord concerné la sélection précise d'un gène de référence fiable pour les expériences de qPCR. Ceci réalisé, l'analyse de l'expression des deux gènes a été entreprise ainsi que les mesures de leurs activités enzymatiques.

Expérimentation

Deux variétés d'ananas ont été utilisées : la variété MD2, résistante au BI ; et la variété Cayenne lisse (SC), sensible.

Chaque variété a fait l'objet d'un traitement au froid en post-récolte (TPR), 10 jours à 9°C puis 10 jours à 25°C. Ce traitement est nécessaire au transport et à la mise en vente des fruits et induisent le BI. Les témoins correspondent aux fruits fraîchement cueillis (T₀).

Principaux résultats

L'expression de 5 gènes de référence a été étudiée dans le but de sélectionner le gène le plus stable « constitutif ». Il s'agit des gènes codant l'actine, le facteur d'élongation α , la cyclophiline, l'adénine phosphorybosyle transférase et la protéine ribosomale L10.

L'expression du gène codant l'actine s'est révélée être la plus stable dans nos conditions expérimentales.

D'après les résultats, l'expression du gène codant la broméline de fruit, ainsi que la mesure de son activité enzymatique sont régulées négativement par le traitement au froid en post-récolte (TPR). La variété résistante MD2 est la plus affectée.

Quant au gène codant la cystatine, il est sur-exprimé chez la variété résistante MD2, et au contraire sous-exprimé chez la variété sensible SC.

Conclusion

La mise au point d'un gène de référence stable pour notre étude permettra de poursuivre l'analyse de l'expression d'autres gènes en qPCR.

La broméline de fruit ainsi que la cystatine semblent être impliquées dans la résistance des ananas au BI.

Postharvest chilling treatment induces distinct expression in fruit bromelain and cystatin in two pineapple (*Ananas comosus* (L) Merr.) varieties differing in their susceptibility to blackheart physiopathy

Astrid-Kim Rimbault^{a,b}, Yasmine Zuily-Fodil^a, Alain Soler^b, Phillipe Mora^a, Maria H. Cruz de Carvalho^{a,1*}.

^a *IBIOS-UMR CNRS 7618 BIOEMCO, Université Paris Est-Créteil (UPEC), 61 avenue du Général de Gaulle, 94010 Créteil cedex 2, France*

^b *CIRAD-PRAM, Quartier Petite Morne, BP214, 97 285 Le Lamentin, Martinique*

* Corresponding author: mhcc@biologie.ens.fr

¹ Present address: Biodiv-UMR CNRS 7618 BIOEMCO, Ecole Normale Supérieure, 46 rue d'Ulm, 75005 Paris, France.

Abstract

Blackheart is a physiological disorder induced by fresh diurnal temperature exposure and during postharvest chilling storage (0° to 21° C). This chilling stress induces a set of physiological alterations that lead to the formation of water-soaked translucent regions and brown spots at the base of the fruitlets, near the core of the fruit. Cysteine proteases, one of the major groups of cellular endoproteases, are involved in many aspects of plant development and stress responses. The aim of this study was to check the involvement of fruit bromelain, the major cysteine protease present in pineapple fruit, and its natural inhibitor (cystatin) in the postharvest chilling response. For this purpose, two pineapple varieties MD2 and Smooth Cayenne differing in their resistance to blackheart physiopathy were used. Quantitative PCR analyses and enzymatic tests showed that postharvest chilling stress induced a down-regulation of fruit bromelain gene expression and enzymatic activity in both varieties, being most significant in the resistant MD2 variety. On the contrary cystatin gene expression was enhanced in the case of the resistant variety whereas it was slightly down regulated in the susceptible one. These results suggest a direct correlation between the control of cysteine protease activity (both at the transcriptional and post-transcriptional levels) and resistance to blackheart physiopathy in pineapple fruits.

Keywords

Blackheart; postharvest; chilling stress; resistance; cysteine proteases; fruit bromelain; cystatin; gene expression

Abbreviations

SC, Smooth cayenne; RII, Relative Injury Index; β -tb, β -tubulin; Cyc, cyclophilin; Act, actin; ef- α , elongation factor 1- α ; Appt, adenine phosphoribosyl transferase; CP, cysteine protease.

1. Introduction

Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) is largely used for processing or as a fresh fruit to local and export markets (Rohrbach *et al.*, 2003). Export of pineapple fresh fruit has seen a huge increase during these last years, reaching up to 2.52 million tons in 2008 (Yacob, 2010). The exportation strategies involve procedures to extend the postharvest life of the fruit during shipping, such as controlled atmospheres and special packaging (Kader, 1994; Fisk *et al.*, 2008; Singh and Pal, 2008). Chilling treatment is widely used to slow down postharvest ripening and maintain adequate fruit quality standards (Laville, 1994). Pineapple fruit is sensitive to fresh diurnal temperatures in the field and to postharvest chilling treatment (0° to 21° C). The chilling stress induces a set of physiological alterations causing visual damages inside the fruit (Teisson, 1972; Teisson *et al.*, 1979; Stewart *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2003a). This physiopathy is known as internal browning (IB) or blackheart (BH) (Swete Kelly and Bartholomew, 1993). Blackheart is characterized by the development of internal symptoms including water-soaked, translucent yellow regions, followed by brown spots at the base of the fruitlets near the core of the fruit (Teisson *et al.*, 1979; Paull and Rohrbach, 1985; Raimbault *et al.*, 2011). Blackheart resulted in huge losses in pineapple trade value due to the flesh aspect and loss of gustative quality of the fruit.

Abiotic stresses have been shown to impair cellular homeostasis of phospholipids and protein contents in the case of drought stress (Zuily *et al.*, 1990; Monteiro de Paula *et al.*, 1993; Simova-Stoilova *et al.*, 2006; Demirevska *et al.*, 2008) and salinity (Parida *et al.*, 2004; Parida *et al.*, 2005a, 2005b; Goudarzi and Pakniyat, 2009). This phenomenon is due to various hydrolytic processes involving lipolytic enzymes (El-Hafid *et al.*, 1989; El Maarouf *et al.*, 1999) and proteases. It has been shown that abiotic stress conditions like drought (Roy-Macauley *et al.*, 1992; Cruz de Carvalho *et al.*, 2001; Hieng *et al.*, 2004; Contour-Ansel *et al.*, 2010), heavy metal (Brunet *et al.*, 2009), salinity (Parida *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2010) and low temperatures (Schaffer and Fischer, 1990; Uchikoba *et al.*, 2003) induce an increase in protease gene expression and enzyme activity. Moreover the responses were found correlate with the susceptibility of the cultivar in plants of the Fabaceae family (Roy-Macauley *et al.*, 1992; Cruz de Carvalho *et al.*, 2001; Dramé *et al.*, 2007; Contour-Ansel *et al.*, 2010) and in cereals like wheat (Demirevska *et al.*, 2008; Simova-Stoilova *et al.*, 2010).

Cysteine proteases (CP) are one of the largest classes of cellular endoproteases, with approximately 40 groups divided into 15 families and 5 clans (Van der Hoorn, 2008; Rawlings *et al.*, 2010). Cysteine proteases are characterized by a Cys residue in their actif

cleft with a nucleophile function once activated by an additional His residue located on the active site (Van der Hoorn, 2008). Cysteine proteases are involved in plant development, in protein turnover and degradation of damaged proteins (Schaller, 2004) and in response to various abiotic and biotic stresses (Schaller, 2004; Dramé *et al.*, 2007). Fruit bromelain (FB) is the major cysteine protease (CP) present in pineapple fruit extracts. It belongs to the CA clan and C1 family (Rowan *et al.*, 1990).

Cystatin is an endogenous inhibitor of cysteine proteases that has been found both in animals and in plants. In plants, cystatin-like proteins are known as phytocystatins (Oliveira *et al.*, 2003). They exhibit specific consensus sequences [LVI]-[AGT]-[RKE]-[FY]-[AS]-[VI]-X-[EDQV]-[HYFQ]-N (Margis *et al.*, 1998) and interact with cysteines proteases via W, G, QxVxG residues (Benchabane *et al.*, 2010). Cystatins are involved in various physiological processes such as protection against pathogens and pests (Lawrence and Koundal, 2002; Habib and Khalid, 2007), program cell death (Solomon *et al.*, 1999), and in response to abiotic stresses like cold, salt (Pernas, 2000) and drought (Diop *et al.*, 2004).

The aim of this study was to determine in what extent cysteine protease, namely fruit bromelain and its natural inhibitor, cystatin, are involved in the postharvest chilling response of two pineapple varieties, MD2 and Smooth Cayenne, differing in their tolerance to chilling stress.

2. Materials and Methods

2.1. Plant culture

Pineapple (*Ananas comosus*. L) plants were grown in the field at a CIRAD station (International Center of Agricultural Research for Development) of Basse Pointe (Martinique; lat 15°N; long 62°W). Plants were grown in field as previously described (Raimbault *et al.*, 2011). Two pineapple varieties were chosen due to their resistance (MD2) and susceptibility (Smooth Cayenne, SC) to blackheart symptoms. Fruits were harvested at maturity stage determined by exterior coloring and sugar content criteria (at least 12° Brix; FAO, 2007). They were selected and collected according to size and colour uniformity and washed with a sodium hypochlorite (100 ppm) solution in order to maintain the fruits in pathogen free conditions.

2.2. Postharvest chilling treatment

Twenty-four fruits were randomly divided into 2 groups of 12 fruits per variety. Six fruits were subjected to postharvest chilling treatment (PCT): 10 days at 9°C in a cold room followed by 10 days at room temperature (25°C). Six fruits per variety were selected as a control (c) and were flash frozen in liquid nitrogen immediately after harvest and sampling. According to this protocol all fruits (c and PCT) were peeled, and both crown and top of the fruit were removed. Samples were flash frozen in liquid nitrogen and kept at - 80°C until needed.

2.3. Fruit membrane injury test (FMI test)

Fruit membrane injury analysis was carried out using a modified [Weerahewa and Adikaram \(2005\)](#) protocol. Samples (5 g) were treated with 25 ml isotonic sucrose solutions (sol) adjusted to sample osmotic pressure (Digital, refractometer, Atago, WM 7) and shaken at 25°C (120 rpm, Digital orbital shaker HS501). Conductivity (L_t) was measured at 15 min intervals during 2 h (conductivity meter, Hanna, HI 99300). The samples were then frozen overnight (- 25°C). After 1h30 at 25°C, the conductivity (L_0) was measured. Relative injury index (RII) was defined according to: $RII = ((L_t - sol) / L_0) (1)$

2.4. RNA extraction

Samples were grind in liquid nitrogen with a mortar and pestle. Total RNA was extracted twice from 200 mg flesh powder using the RNeasy plant mini kit (Qiagen) with a DNase treatment according to the manufacturer's instructions. RNA content was measured at $A_{\lambda 260 \text{ nm}}$ (Nanodrop, ND1000). Total RNA purity and integrity were checked using $A_{\lambda 260/280}$ ratio and electrophoresis (1 % agarose gel) respectively.

2.5. Primer design and cDNA cloning

Specific primers (Table 1) for pineapple fruit bromelain pFB13 (cysteine protease; D14058) and cystatin AcCYS1 (EU937516) were designed using the PrimerPy software (<http://code.google.com/p/oligobench/wiki/PrimerPy>) using the sequences obtained from GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Specific primers were also designed for three reference genes, Cyclophilin (cyclo), actin (act), and ribosomal protein L10 (prl10) obtained from a pineapple database (<http://www.pgcl.com.au>; [Moyle et al., 2005](#)) (Table 1).

For two other new reference genes: elongation factor1- α (ef- α) and adenine phosphoribosyl transferase (aprt), degenerate primers were designed from sequences of monocot plants. Consensus sequences were selected by multi-alignment software (http://www.infobiogen.fr/services/analyseq/cgi-bin/clustalw_in.pl). The synthesis of cDNA was made from 1 μ g of total RNA using the Omniscript® Reverse transcription kit (Qiagen). PCR experiments (Mastercycler, Eppendorf, France) were as followed: 5 min at 95°C followed by 30-35 cycles of: 30 s at 94°C, 30 s at T°: 56-62°C (depending on the primers), 30–120 s at 72°C (depending on target gene length) then, 10 min at 72°C.

Table 1

Primer sequences of five reference genes and two target genes used in qPCR experiments in pineapple fruits.

Name	Accession number	Forward primer 5'-3'	Reverse primer 5'-3'	Length (bp)
Ribosomal protein L10 (Rpl10)	Contig8	CCGTGGAGAAGCACTATCA	CCCGACCAACATAGCAGTT	176
Cyclophilin (Cyc)	Contig130	GATCGTGATGGAGCTGTAC	ACTTCTCGTCGGCGAACTT	227
Adenine phosphoribosyl transferase (Aprt)	HM153704	TCATCCCATTAAGAAAGCCAAG	CAGCACATAGAGTTCCTCC	166
elongation factor 1- α (ef- α)	HM153703	CTCTTGAGTGACGGCAGA	GGTGGACCTCTCAATCATGT	190
Actin (Act)	Contig 42	GTGGCACTTGACTTTGAGCA	CTTCCTGATATCCACATCGC	170
Fruit bromelain (FB)	D14058	CAAGGACAAACGACGAGAAGA	CAAATGACACCACTGGCTC	200
Cystatin (AcCYS1)	EU937516	CCCCTCAATAACGAGAACG	TCTTCTTGCCAGCATCATTC	200

The PCR amplification products were cloned using the pGEM-T Easy Vector Plasmid System I (Promega, France) and inserted into the *E. coli* strain GT869 competent cells by heat shock. After selection of the recombinant bacteria, plasmid DNA was isolated using Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System kit (Promega, France) following the manufacturer's instructions. DNA Sequencing was performed by Genoscreen (Lille, France). The cloned partial cDNAs of ef- α and aprt genes were registered in GenBank with the accession numbers HM153703 and HM153704, respectively. Specific primers for the cloned and sequenced reference cDNAs were designed as described above (Table 1).

2.6 Expression analysis by quantitative PCR (qPCR)

Quantitative real-time PCR of reference and target genes was conducted in a LightCycler™ (Roche) using gene specific primers. Reactions were carried out with 10 μ l of final PCR reaction solution containing template cDNA 1 μ l, primer mix 1 μ l (0.5 μ M final)

(forward and reverse primers), water 5 µl, and SYBR®green master mix 2 µl (Applied Biosystems). The final amount of cDNA template assayed was equivalent to 25 ng of RNA.

Three independent qPCR runs were performed as technical inter-run repetitions, with 3 intra-run replicates as biological repetitions, corresponding to three samples of three different fruits. Conditions for qPCR experiments were as followed: 10 min at 95°C followed by 30 cycles with 95°C for 15 s and 1 min at 59°C.

Data were normalized using actin as a reference gene, selected amongst five potential reference genes. Quantitative real-time PCR was performed according to the method of Pfaffl (2001). Relative expression was obtained by the equation:

$$((E_{\text{target}})^{\Delta C_{\text{ttarget}}(\text{control-sample})}) / ((E_{\text{ref}})^{\Delta C_{\text{tref}}(\text{control-sample})}) \quad (2)$$

2.7. Cysteine protease enzymatic assay

One hundred mg of pineapple flesh powder was mixed during 2 min by vortexing with 3 % PVP and 500 µl of 0.1 M Hepes buffer (pH 7.3) containing 2 mM DTT. The solution was centrifuged at 14000 x g (Himac, VWR, CT 15RE) at 4°C for 20 min. The supernatant was assayed for proteolytic activity (Hale *et al.*, 2005). Cysteine proteinase activity was determined by monitoring the release of p-nitroaniline from a specific substrat Bz-Phe-Val-Arg-pNA (Sigma-Aldrich, B7632) used at 200 µg.ml⁻¹ final concentration (Hale *et al.*, 2005). The reaction mixture contained 140 µl of 0.1 M Hepes buffer containing 10 % PMF, 5 mM EDTA, 5 mM L-cysteine with 50 µl protein extract and 10 µl substrate. Absorbance at $A_{\lambda 405\text{nm}}$ was measured at 30 s intervals during 30 min using a plate reader (Tecan, infinite ® M1000 with injector module). The rate of p-nitroaniline released was calculated using $\epsilon = 8480 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Catalytical activity (CA) was calculated from the change in absorbance vs time using the linear portion of the curve ($\Delta \text{Abs} \cdot \text{s}^{-1}$). Protein content was determined according to Bradford (1976) with bovine serum albumin (BSA) as a standard.

Specific activity (SA) was converted to nkat.mg⁻¹ of protein using the formula:

$$\text{SA} = [\text{CA} \times 1000] / \text{protein quantity} \quad (3)$$

3. Results and Discussion

3.1. Fruit membrane injury test in two varieties of pineapple fruit, MD2 and Smooth Cayenne, submitted or not to postharvest chilling treatment

Electrolyte leakage has been previously correlated with membrane damage after water stress (Vasquez-Tello *et al.*, 1990; Baji *et al.*, 2001). We have deeply modified (Weerahewa and Adikaram (2005) protocol to fit with pineapple fruit characteristics under our experimental conditions.

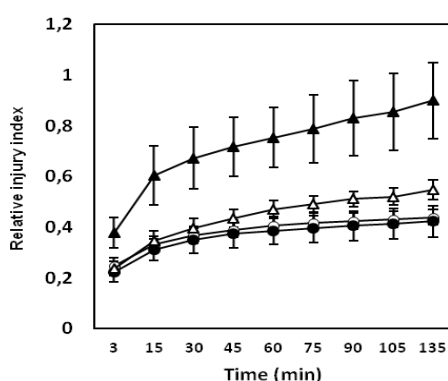


Fig.1. Kinetic of fruit Relative Injury Index in two pineapples varieties differing in their susceptibility to Blackheart. Smooth Cayenne: Δ control (c); \blacktriangle Postharvest Chilling Treatment PCT; MD2: \circ control (c); \bullet Postharvest Chilling Treatment PCT. Values are means \pm SD of three independent experiments each with 3 replicates.

According to the results (Fig.1), the relative injury index values differed depending on the variety and the applied treatment. In control condition, resistant MD2 variety, showed a lower relative injury index than the susceptible SC, being 44 % and 55 % after 135 min respectively. Variance analysis showed that the variety had a significant effect on membrane injury under control conditions ($P < 0.05$). Under postharvest chilling conditions the susceptible variety (SC) showed a significantly higher relative injury index (RII) than the resistant MD2, being of 90 % and 42 % after 135 min ($P < 0.05$), respectively.

These results suggest that fruit membrane injury (assessed by electrolyte leakage measurements) correlates well with blackheart symptoms. This observation is in line with the results obtained by Weerahewa and Adikaram (2005) on different susceptible pineapple cultivars, Mauritius (Queen) and Kew (Smooth Cayenne), where brown flesh tissue displayed higher electrolyte leakage than flesh tissue with no visible symptom both being from the same

fruit. Moreover pineapple treated with methyl jasmonate, known to reduce blackheart symptoms, showed a lower electrolyte leakage as compared to untreated pineapple fruits (Nilprapruck *et al.*, 2008). In the present work the resistant MD2 variety showed no significant difference between treatment and control conditions ($P < 0.05$). This is in agreement with previous results showing that MD2 did not develop blackheart symptoms under postharvest chilling treatment (Raimbault *et al.*, 2011).

These results showed that electrolyte leakage data correlated well the first symptoms of blackheart as described by Teisson *et al.* (1979) namely flesh translucency which is the results of a loss of cellular integrity. In the same way tomato develop membrane damage and dysfunction after chilling stress (Almeida and Huber, 2010). Taken together our results strongly suggest that postharvest chilling treatment could affect cellular membrane integrity which correlated with susceptibility to blackheart.

3.2. Selection of reference gene for qPCR studies

Analysis of gene expression by real time PCR requires accurate internal reference genes to avoid bias in result interpretation (Gutierrez *et al.*, 2008; Udvardi *et al.*, 2008; Bustin *et al.*, 2009; Guenin *et al.*, 2009; Vandesompele *et al.*, 2002). The most commonly used reference genes for the normalization of gene expression in qPCR analyses are β -tubulin (β -tb), cyclophilin (Cyc), actin (Act), elongation factor 1- α (ef- α), 18 sRNA, adenine phosphoribosyl transferase (Apt), cytoplasmic ribosomal protein (RPL2), glyceraldehyde -3- phosphate dehydrogenase (GAPDH), phosphoglycerate kinase (PGK), catalytic subunit of protein phosphatase 2 A (PP2Acs) (Nicot *et al.*, 2005; Lovdal et Lillo, 2009; Zhang *et al.*, 2009). In the present study, primers were designed for five reference genes (Table 1). Available cDNA sequences were obtained from Genbank and pineapple contig databases. Unknown sequences were obtained after cloning and sequencing (Table 1). Five primer pairs were designed according to specific criteria for qPCR procedures (Udvardi *et al.*, 2008; Bustin *et al.*, 2009): 140 to 250 bp amplicon lengths, optimal $T_M = 56^\circ\text{C}$ and 40 to 60 GC % (Table 1). PCR products of each primer set were analysed using melting-curve step at $60-95^\circ\text{C}$, given a specific single peak (data not shown).

Reference genes were selected according to 2 parameters (M) average expression stability, and (V) a pairwise variation (Vandesompele, 2002). Actin and ef- α showed the lowest M value among the five references genes: 0.592 and 0.643 M value respectively (Fig. 2). V

value for Pairwise variation was 0.087 and 0.115 for actin and ef- α respectively with the addition of another reference gene (Fig. 3).

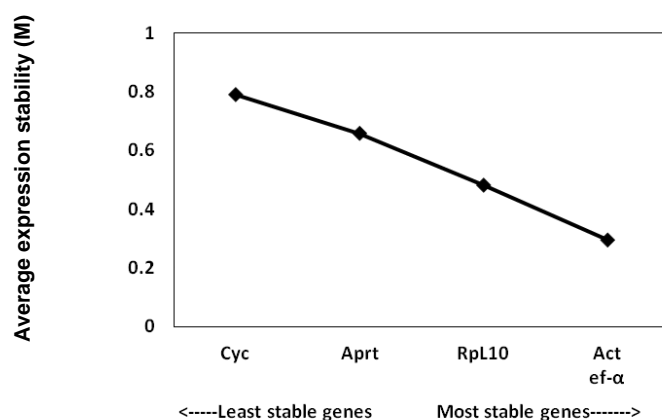


Fig.2. Average expression stability values (M) of references genes during the stepwise exclusion of the least stable control genes. (Cyc) Cyclophilin, (ef- α) elongation factor 1- α , (Act) actin, (RpL 10) ribosomal protein L 10, (Aprt) adenine phosphoribosyl transferase.

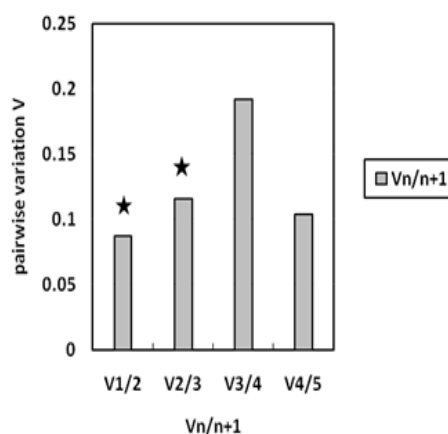


Fig.3. Determination of the optimal number of reference genes for normalization by pairwise variation (V_n/V_{n+1}) analysis between the normalization factor NF_n and NF_{n+1} for accurate normalization of qPCR data.

Results showed that actin and elongation factor α (ef- α) were the most stable reference genes tested (Fig. 2) according to GeNorm analysis (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>). Thus, actin and ef- α were both appropriate reference genes to be used in qPCR studies in our experimental conditions. Furthermore, 0.15 is considered to be a good cut-off for the pairwise variation in which the inclusion of another additional reference gene is unnecessary to obtain accurate real time PCR normalization (Vandesompele *et al.*, 2002). Thus, in the present study it was not necessary to use two reference genes to normalize gene expression. Studies on

potato and tomato plants submitted to abiotic stresses (cold, salt and drought) showed that elongation factor1- α , ubiquitin and actin genes were reliable reference genes for qPCR studies in leaf tissues (Nicot *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2009; Lovdal and Lillo, 2009). Up to now, very few studies have focused on qPCR analysis of fruit gene expression. Nevertheless, our results are in agreement with those from Moyle *et al.* (2005) where actin was used as the unique reference gene for the detection of metallothionein gene expression from unripe and ripe pineapple fruit flesh.

3.3 Fruit bromelain (pFB13) gene expression in SC and MD2 pineapple varieties

The transcript level of fruit bromelain (pFB13; D14058) was measured by qPCR analyses on the two pineapple varieties, MD2 and SC, submitted or not to postharvest chilling treatment (Fig. 4). According to the Pfaffl equation (2001) “1” is the cut-off value corresponding to the hypothesis that there are no differences between the thresholds cycles (Ct) for treated and control samples. Thus, pFB13 gene expression was down regulated for both MD2 resistant and SC susceptible varieties, with approximately 90 % and 20 % reduction respectively, under postharvest chilling treatment conditions (Fig. 4).

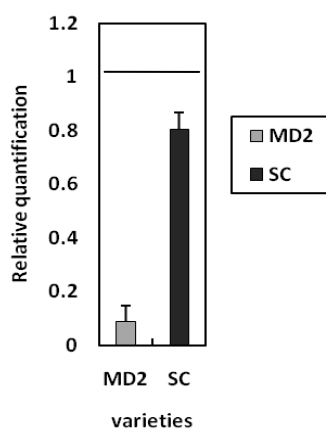


Fig. 4. Relative quantification of fruit bromelain gene under postharvest chilling treatment for MD2 (resistant) and SC (Smooth Cayenne; susceptible) varieties using qPCR. Results were obtained using the Pfaffl (2001) equation and actin gene as an internal control. Data +/-SD are the mean of three independent experiments.

According to these results, postharvest chilling treatment induced an inhibition of fruit bromelain gene expression which was more pronounced in the resistant variety (Fig. 4).

Cysteine proteases (CP) are involved in the breakdown of storage proteins during seed germination (Oliveira *et al.*, 2003), in protein remobilization during leaf senescence (Chen *et al.*; 2002; Esteban-Garcia *et al.*, 2010) and in the response to various abiotic stress such as

water deficit (Dramé *et al.*, 2007), heavy metal pollution (Brunet *et al.*, 2009) and programmed cell death (Solomon *et al.*, 1999). They participate to the degradation of oxidised and/or damaged proteins generated under stress, hence contributing to their turnover (Schaller, 2004).

Tomato fruits submitted to cold treatment showed an accumulation of CP transcripts (Schaffer and Fischer, 1990) while chilling stress inhibited CP activities in maize seedling (Prasad, 1996). In the same way postharvest chilling treatment of pineapple fruits resulted in a decrease in pFB13 gene expression.

The variety resistant to blackheart MD2, was the most affected by pFB13 gene down regulation under postharvest treatment conditions as compared to the SC susceptible variety. These results are in agreement with those previously reported on wheat cultivars differing in their resistance to drought, where CP transcript accumulation was lower in the drought resistant variety (Simova-Stoilova *et al.*, 2006). According to our results resistance and susceptibility to blackheart physiopathy could be related to fruit bromelain gene expression, the resistant variety showing the lower level of pFB13 transcripts under postharvest chilling treatment.

3.3 Effect of postharvest chilling treatment on CP enzymatic activities

The enzymatic activity of CP was studied in resistant MD2 and susceptible SC pineapple varieties in fruits submitted or not (control) to postharvest chilling treatment.

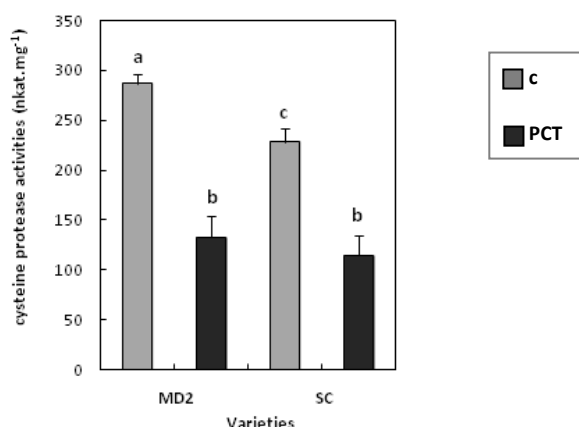


Fig. 5. Effect of postharvest chilling treatment on cysteine protease activity in two varieties of pineapple: MD2 (resistant) and Smooth Cayenne (SC) (susceptible), submitted to control condition (c), and to postharvest chilling treatment (PCT). Data \pm SD are the mean of three independent experiments. Letters a, b, c: values significantly different according to Tukey test ($P < 0.05$).

In the case of control fruits, MD2 enzymatic activity was 20 % higher than that of SC (Fig. 5). Under postharvest chilling treatment a decrease in CP activity occurred in both MD2 and SC varieties ($P < 0.001$) reaching 57 % and 48 % reduction respectively (Fig.5).

According to these results, postharvest chilling treatment induced an inhibition of CP activity depending on the variety being higher in the resistant MD2. ANOVA analyses showed that both postharvest chilling treatment and variety had a significant effect on CP enzymatic activity ($P < 0.001$). However there were no interactions between treatment and variety with a p-value of 0.07484. The results obtained in the case of pFB13 gene expression as well as of CP enzymatic activity showed a negative effect of postharvest chilling treatment.

3.5 Effect of post harvest chilling treatment on inhibitor cystatin gene expression

Previous studies have related cystatin gene expression to plant tolerance to several abiotic stresses like drought (Diop *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2007), salt and cold stress (Zhang *et al.*, 2008). In order to check postharvest chilling stress in cystatin gene expression, specific primers were designed for AcCYS1 (EU937516), a pineapple cystatin located in the apoplasm showing a large inhibitory effect on cysteine proteases from pineapple (Neuteboom *et al.*, 2009).

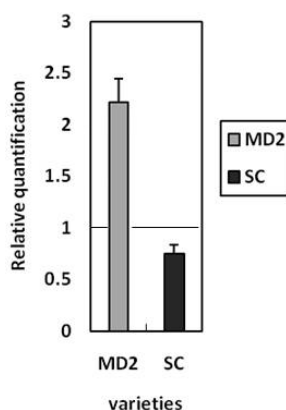


Fig. 6. Relative quantification of cystatin gene expression under postharvest chilling treatment for MD2 (resistant) and (Smooth Cayenne; susceptible) varieties using qPCR. Results were obtained according to Pfaffl (2001) equation and actin as an internal control. Data \pm SD are the mean of three independent experiments.

According to the results (Fig.6), postharvest chilling treatment induced a strong up-regulation of AcCYS1 gene expression in the tolerant MD2 variety (relative quantification value: 2.21, Fig. 6). On the contrary, the susceptible SC variety showed an inhibition in AcCYS1 gene transcript accumulation, corresponding to a 25 % reduction as compared to

control conditions. Since cystatin gene expression was higher in MD2 resistant than in susceptible SC, it correlated well with postharvest chilling resistance/sensibility of the varieties. This agrees with previous results regarding drought tolerant and susceptible cowpea cultivars (Diop *et al.*, 2004). Cystatin regulates the activity of endogenous cysteine proteases involved in biotic or abiotic stress responses (Pernas *et al.*, 2000). Thus cystatins could have a protective effect preventing cellular damages induced by excessive cysteine protease activity under stress, being more pronounced in the case of stress resistant varieties/cultivars.

In pineapple fruit, cysteine proteases were shown to be specifically inhibited by AcCYS1 and not by other pineapple cystatins (Neuteboom *et al.*, 2009). AcCYS1 is a 27 kDa protein containing an extended N-terminal trunk (NTT) of 63 residues, rich in alanine and glutamate residues. It is a very strong natural cysteine protease inhibitor, inhibiting 95 % of stem and fruit bromelains in pineapple fruit (Neuteboom *et al.*, 2009). According to our results AcCYS1 could be involved in the resistance to blackheart physiopathy induced by postharvest chilling stress by regulating the activity of cysteine proteases.

4. Conclusion

The present study shows that both fruit bromelain (pFB13) and cystatin (AcCYS1) gene expression as well as the overall CP activities were modulated by postharvest chilling stress. Measurements of cysteine protease (pFB13) and cystatin (AcCYS1) quantitative gene expression correlated well with the resistance to postharvest chilling treatment. Thus it could be hypothesised that the control of cysteine protease activity could be achieved almost partly by the cystatin inhibitor activity. The distinct response of the varieties concerning cysteine protease pFB13 and cystatin inhibitor Ac CYS1 gene expression could be used through PCR experiments in breeding programs to improve post-harvest chilling resistance in pineapples fruits.

Acknowledgements

The authors which to thank Stéphanie Giusti-Miller and Sandrine Chantepie for technical assistance.

References

- Almeida, D.P.F., Huber, D.J., 2010. Chilling-induced changes in the apoplastic solution of tomato pericarp. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 85, 312-316.
- Baji, M., Kinet, J.M., Lutts, S., 2001. The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. *Plant Growth Regul.* 1-10.
- Benchabane, M., Schlüter, U., Vorster, J., Goulet, M.C., Michaud, D., 2010. Plant cystatins. *Biochimie.* 92, 1657-1666.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brunet, J., Varrault, G., Zuily-Fodil, Y., Repellin, A., 2009. Accumulation of lead in the roots of grass pea (*Lathyrus sativus* L.) plants triggers systemic variation in gene expression in the shoots. *Chemosphere.* 77, 113-1120.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T., 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin. Chem.* 55, 611-622.
- Chen, G.H., Huang, L.T., Yap, M.N., Lee, R.H., Huang, Y.J., Cheng, M.C., Chen, S.C.G., 2002. Molecular Characterization of a Senescence-Associated Gene Encoding Cysteine Proteinase and its Gene Expression during Leaf Senescence in Sweet Potato. *Plant Cell Physiol.* 43, 984-991.
- Contour-Ansel, D., Torres-Franklin, M.L., Zuily-Fodil, Y., Cruz de Carvalho, M.H., 2010. An aspartic acid protease from common bean is expressed 'on call' during water stress and early recovery. *J. Plant Physiol.* 167, 1606-1612.
- Cruz de Carvalho, M., D'Arcy-Lameta, A., Roy-Macauley, H., Gareil, M., El Maarouf, H., Pham-Thi, A.T., Zuily-Fodil, Y., 2001. Aspartic protease in leaves of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.): enzymatic activity, gene expression and relation to drought susceptibility, *FEBS Lett.* 492, 242-246.
- Demirevska, K., Simova-Stoilova, L., Vassileva, V., Vaseva, I., B. Grigorova, B., Feller, U., 2008. Drought-induced leaf protein alterations in sensitive and tolerant wheat varieties. *Gen. Appl. Plant Physiol. Spec. Issue.* 34, 79-102.
- Diop, N.N., Kidrič, M., Repellin, A., Gareil, M., D'Arcy-Lameta, A., Pham Thi, A.T., Zuily-Fodil, Y., 2004. A multicystatin is induced by drought-stress in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) leaves. *FEBS Lett.* 577, 545-550.

Dramé, N.K., Clavel, D., Repellin, A., Passaquet, C., Zuily Fodil, Y., 2007. Water deficit induces variation in expression of stress-responsive genes in two peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars with different tolerance to drought. *Plant Physiol. Bioch.* 45, 236-243.

El-Hafid, L., Pham Thi, A. T., Zuily-Fodil, Y., Vieira da Silva, J.B., 1989. Enzymatic breakdown of polar lipids in cotton leaves under water stress. Degradation of monogalactosyldiacylglycerol. *Plant Physiol. Bioch.* 27, 495-502.

El Maarouf, H., Zuily-Fodil, Y., Gareil, M., D'Arcy-Lameta, A., Pham Thi, A. T., 1999. Enzymatic activity and gene expression under water stress of phospholipase D in two cultivars of *Vigna unguiculata* L. Walp differing in their drought tolerance. *Plant Mol. Biol.* 39, 1257-1265.

Esteban-García, B., Garrido-Cárdenas, J.A., Alonso, D.L., García-Maroto, F., 2010. A distinct subfamily of papain-like cystein proteinases regulated by senescence and stresses in *Glycine max*. *J. Plant Physiol.* 167, 1101-1108.

Fao. 2007. Codex alimentarius. Fruits et legumes frais, first ed. Rome. 41.

Fisk, C.L., Silver, A.M., Strik, B.C., Zhao, Y., 2008. Postharvest quality of hardy kiwifruit (*Actinidia arguta* Ananasnaya) associated with packaging and storage conditions. *Postharvest Biol. Technol.* 47, 338-345.

Goudarzi, M., and Pakniyat, H., 2009. Salinity causes increase in proline and protein contents and peroxidase activity in wheat cultivars. *J. Appl. Sci.* 9, 348-353.

Guénin, S., Mauriat, M., Pelloux, J., Van Wuytswinkel, O., Bellini, C., Gutierrez, L., 2009. Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validations of references. *J. Exp. Bot.* 60, 487-493.

Gutierrez, L., Mauriat, M., Pelloux, J., Bellini, C., Van Wuytswinkel, O., 2008. Towards a Systematic Validation of References in Real-Time RT-PCR. *Plant Cell.* 20, 1734-1735.

Habib, H., Khalid, M.F., 2007. Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. *BMBR.* 2, 068-085.

Hale, L.P., Greer, P.K., Trinh, C.T., James, C.L., 2005. Proteinase activity and stability of natural bromelain preparations. *Int. Immunopharmacol.* 5, 783-793.

Hieng, B., Ugrinović, K., Sustar-Vozlic, J., Kidric, M., 2004. Different classes of proteases are involved in the response to drought of *Phaseolus vulgaris* L. cultivars differing in sensitivity. *J. Plant Physiol.* 161, 519-530.

Huang, Y., Xiao, B., Xiong, L., 2007. Characterization of a stress responsive proteinase inhibitor gene with positive effect in improving drought resistance in rice. *Planta.* 226, 73-85.

Kader, A.A., 1994. Modified and controlled atmosphere storage of tropical fruits. 1993, in: Champ, B. R., *et al.*, (Eds.), Postharvest handling of tropical fruits. Proc. Int. Confer. Chiang Mai, Thailand, July 1993. ACIAR Proc. No. 50, pp. 239-249.

Laville, E., 1994. La protection des fruits tropicaux après récolte. CIRAD-COLEACP. Tec & Doc-Lavoisier, pp. 11-13.

Lawrence, P.K., and Koundal, K.R., 2002. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *Electron. J. Biotech.* 5, 93-109.

Lovdal, T., Lillo, C., 2009. Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in tomato subjected to nitrogen, cold, and light stress. *Anal. Biochem.* 387, 238-242.

Margis, R., Reis, E.M., Villeret, V., 1998. Structural and phylogenetic relationships among plant and animal cystatins. *Arch. Biochem. Biophys.* 359, 24-30.

Mayer, A.M., 1987. Polyphenol oxidase and peroxidase in plants recent progress. *Phytochemistry.* 26, 11-20.

Mettam, G.R., Adams, L.B., 1999. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281-304.

Monteiro de Paula, F., Pham Thi, A.T., Zuily-Fodil, Y., Ferrari-Iliou, R., Vieira da Silva, J., Mazliak, P., 1993. Effects of water stress on the biosynthesis and degradation of polyunsaturated lipid molecular species in leaves of *Vigna unguiculata*. *Plant Physiol. Bioch.* 31, 707-715.

Moyle, R.L., Crowe, M.L., Ripi-Koia, J., Fairbairn, D.J., Botella, J.R., 2005. PineappleDB: An online pineapple bioinformatics resource. *BMC Plant Biol.* 5, 21.

Neuteboom, L.W., Matsumoto, K.O., Christopher, D.A., 2009. An Extended AE-Rich N-Terminal Trunk in Secreted Pineapple Cystatin Enhances Inhibition of Fruit Bromelain and Is Posttranslationally Removed during Ripening. *Plant Physiol.* 151, 515-527.

Nicot, N., Hausman, J.F., Hoffmann, L., Evers, D., 2005. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *J. Exp. Bot.* 56, 2907-2914.

Nilprapruk, P., Pradisthakarn, N., Authanithe, F., Keebjan, P., 2008. Effect of Exogenous Methyl Jasmonate on Chilling Injury and Quality of Pineapple (*Ananas comosus* L.) cv. Pattavia. *Silpakorn Univ. Sci. Tech. J.* 2, 33-42.

Parida, A.K., Das, A.B., Mitra, B., Mohanty, P., 2004. Salt-stress induced alterations in protein profile and protease activity in the mangrove (*Bruguiera parviflora*). *Z. Naturforsch.* 59, 408-414.

- Parida, A.K., Das, A.B., 2005a. Salt tolerance and salinity effects on plants: A review. *Ecotox. Environ. Safe.* 60, 324-349.
- Parida, A.K., Mitra, B., Das, A.B., Das, T.K., Mohanty, P., 2005b. High salinity reduces the content of a highly abundant 23 kDa protein of the mangrove *Bruguiera parviflora*. *Planta* 221, 135-140.
- Paull, R.E., Rohrbach, K.G., 1985. Symptom development of chilling injury in pineapple fruit (*Ananas comosus*). *JASHS.* 110, 100-105.
- Pernas, M., Sanchez-Monge, R., Salcedo, G., 2000. Biotic and abiotic stress can induce cystatin expression in chestnut. *FEBS Lett.* 467, 206-210.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Oxford Univ. Press Nucleic Acids Res.* 29, 2002-2007.
- Yacob, A., 2010. Global overview and trade of the pineapple industry. Abstracts of the 7th International Pineapple Symposium. July 2010, Malaysia. Issue No. 17 Addendum to Newsletter Pineapple Working Group of the I.S.H.S. August, 2010.
- Prasad, T.K., 1996. Mechanisms of chilling-induced oxidative stress injury and tolerance in developing maize seedlings: changes in antioxidant system, oxidation of proteins and lipids, and protease activities. *Plant J.* 10, 1017-1026.
- Raimbault, A.K., Marie-Alphonsine P.A., Horry J.P., Francois-Haugrin M., Romuald K., Soler A., 2011. Polyphenol oxidase and peroxidase expression in four pineapple varieties (*ananas comosus* L.) after a chilling injury. *J. Agr. Food Chem.* 59, 342-348.
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J., Bateman, A., 2010. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* 38, D227-D233.
- Rohrbach, K.G., Leal, F., Coppens D'Eeckenbrugge, G., 2003. History, distribution and world production, in : Bartholomew, P.E., Paull, R.E., Rohrbach, K. G (Eds.), *The pineapple : Botany, production and uses*. Wallingford : CABI Publishing, pp. 1-12.
- Rowan, A.D., Buttle, D.J., Barrett, A.J., 1990. The cysteine proteinases of the pineapple plant. *Biochem. J.* 266, 869-875.
- Roy-Macauley, H., Zuily-Fodil, Y., Kidric, M., Pham Thi, A.T., Viera de Silva, J., 1992. Effect of drought stress on proteolytic activities in *Phaseolus* and *Vigna* leaves from sensitive and resistant plants. *Physiol. Plantarum.* 85, 90-96.
- Schaller, A., 2004. A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta.* 220, 183-197.
- Schaffer, M.A., Fischer. R.L., 1990. Transcriptional Activation by Heat and Cold of a Thiol Protease Gene in Tomato. *Plant Physiol.* 93, 1486-1491.

- Simova-Soilova, L., 2010. Proteolytic activity and cysteine protease expression in wheat leaves under severe soil drought and recovery. *Plant Phys. Biochem.* 48, 200-206.
- Simova-Stoilova, L., Vassileva, V., Petrova, T., Tsenov, N., Demirevska, K., Feller, U., 2006. Proteolytic activity in wheat leaves during drought stress and recovery. *Gen. Appl. Plant Physiol. Spec. Issue.* 91-100.
- Singh, S.P., Pal, R.K., 2008. Controlled atmosphere storage of guava (*Psidium guajava* L.) fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 47, 296-306.
- Solomon, M., Belenghi, B., Delledonne, M., Menachem, E., Levine, A., 1999. The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. *Plant Cell.* 11, 431-44.
- Stewart, R.J., Sawyer, B.J.B., Bucheli, C.S., Robinson, S.P., 2001. Polyphenol oxidase is induced by chilling and wounding in pineapple. *Aust. J. Plant Physiol.* 28, 181-191.
- Stewart, R.J., Sawyer, B. J.B., Robinson, S. P., 2002. Black heart development following chilling in fruit of susceptible and resistant pineapple cultivars. *Aust. J. Exp. Agr.* 42, 195-199.
- Swete Kelly, D., Bartholomew, D.P., 1993. Pineapple pests and disorders, in: RH Broadley, RE Wassaman, E Sinclair, (Eds.), *Other Disorders*. QDPI. Brisbane, pp. 61.
- Teisson, C., 1972. Studies on internal browning of pineapple. *Fruits.* 27, 603-612.
- Teisson C., Combres J.C., Martin Prevel, P., Marchal, J., 1979. Le brunissement interne de l'ananas. III. Symptomatologie. IV. Approche biochimique du phénomène. *Fruits.* 34, 315-339.
- Uchikoba, T., Fukumoto, S., Onjo, M., Okubo, M., Arima, K., Yonezawa, H., 2003. The development of cysteine proteases in freesia corms during responses to chilling. *J. Therm. Biol.* 28, 555-562.
- Udvardi, M.K., Czechowski, T., Scheible, W.R., 2008. Eleven Golden Rules of Quantitative RT-PCR. *Plant Cell.* 20, 1736-1737.
- Van der Hoorn, R.A.L., 2008. Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 191-223.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3, 0034.1-0034.11.
- Vasquez-Tello, A., Zuily-Fodil, Y., Pham Thi, A.T., Vieira Da Silva, J.B., 1990. Electrolyte and Pi Leakages and Soluble Sugar Content as Physiological Tests for Screening Resistance to Water Stress in *Phaseolus* and *Vigna* Species. *J. Exp. Bot.* 41, 827-832.
- Wang, J., Li, X., Liu, Y., Zhao, X., 2010. Salt stress induces programmed cell death in *Thellungiella halophila* suspension-cultured cells. *J. Plant Physiol.* 167, 1145-1151.

Weerahewa, D., Adikaram, N.K.B., 2005. Some biochemical factors underlying the differential susceptibility two cultivars to internal browning disorder. Ceylon J. Sci. 34, 7-20.

Zhang, X., Liu, S., Takano, T., 2008. Two cysteine proteinase inhibitors from *Arabidopsis thaliana*, AtCYSa and AtCYSb, increasing the salt, drought, oxidation and cold tolerance. Plant Mol. Biol. 68, 131-143.

Zhang, J.L., Liu D.H., Wang Z.H., Yu C., Cao J.H., Wang C.T., Jin D.M., 2009. Expression pattern of GS3 during Panicle development in rice under drought stress: Quantification normalized against selected housekeeping genes in real-time PCR. Asian J. Plant Sci. 8: 285-292.

Zhou, Y., Dahler, J.M., Underhill, S.J.R., Wills, R.B.H., 2003a. Enzymes associated with blackheart development in pineapple fruit. Food Chem. 80, 565-572.

Zhou, Y.C., O'Hare, T.J., Jobin-Decor, M., Underhill, S.J.R., Wills, R.B.H., Graham, M.W., 2003b. Transcriptional regulation of a pineapple polyphenol oxidase gene and its relationship to blackheart. Plant Biotechnol. J. 1, 463-478.

Zuily-Fodil, Y., Vasquez Tello, A., Vieira da Silva, J., 1990. Effect of water deficit on cell permeability and on chloroplast integrity. Bull. Soc. Bot. France. 137, 115-123.

CHAPITRE 3: article 3:

A novel aspartic acid protease gene from pineapple fruit (*Ananas comosus* (L) Merr.): cloning, characterization, and relation to postharvest chilling stress resistance

Cette étude fait l'objet d'un article en cours de soumission: Raimbault, A.K^{a,b}, Zuily-Fodil, Y^a, Repellin, A.^a, Soler, A.^b, Cruz de Carvalho, M.H.^{a,*}: “A novel aspartic acid protease gene from pineapple fruit (*Ananas comosus* (L) Merr.): cloning, characterization, and relation to postharvest chilling stress resistance”.

Le chapitre précédent a montré l'implication d'une protéase à cystéine, la broméline de fruit et de son inhibiteur naturel, la cystatine dans la résistance des ananas au BI. Des travaux du laboratoire menés sur les contraintes abiotiques ont également mis en évidence l'intervention d'autres endoprotéases en réponse au déficit hydrique, et notamment la protéase à acide aspartique.

L'objectif de cette étude est de tenter de caractériser un gène chez l'ananas codant une protéase à acide aspartique et d'évaluer son potentiel de réponse à la contrainte au froid en post-récolte.

Les travaux ont consisté à caractériser un ADNc complet codant une protéase à acide aspartique. L'expression du gène a été étudiée par qPCR en utilisant le gène codant l'actine comme gène de référence. L'analyse des activités enzymatiques de la protéine correspondante a également été menée.

Expérimentation

Deux variétés d'ananas ont été utilisées : la variété MD2, résistante au BI et la variété Smooth Cayenne (SC), sensible.

Chaque variété a fait l'objet d'un traitement au froid en post-récolte (TPR), 10 jours à 9°C puis 10 jours à 25°C. Les témoins correspondent aux fruits fraîchement cueillis (T₀).

Principaux résultats

L'ADNc complet *AcAPI* codant une endoprotéase à acide aspartique a été caractérisé, cloné et séquencé pour la première fois. Ses caractéristiques structurales ont été précisées et son arbre phylogénique a été réalisé. *AcAPI* possède des caractéristiques structurales typiques des phytépsines.

L'analyse phylogénique de *AcAPI* a révélé que cette séquence est proche des protéases à acide aspartique des monocotylédones et plus particulièrement de celle d'*Oryza sativa*.

En réponse au TPR l'expression du gène *AcAPI* et l'activité enzymatique correspondante sont stimulées chez la variété résistante MD2 et au contraire inhibée chez la variété sensible SC.

A titre d'hypothèse la protéinase à acide aspartique AsAP1 pourrait être impliquée dans les processus de résistance au BI et pourrait constituer un marqueur biochimique et moléculaire utile pour le criblage des variétés d'ananas pour la résistance au brunissement interne.

Conclusions

Un cDNA AcAP1 a été isolé pour la première fois chez l'ananas.

La protéase à acide aspartique AcAP1, contribue à la résistance des ananas au BI.

A novel aspartic acid protease gene from pineapple fruit (*Ananas comosus* (L) Merr.): cloning, characterization and relation to postharvest chilling stress resistance

Astrid-Kim Rimbault^{a,b}, Yasmine Zuily-Fodil^a, Anne Repellin^a, Alain Soler^b, Maria H. Cruz de Carvalho^{a,*}.

^a *IBIOS-UMR CNRS 7618 BIOEMCO, Université Paris Est Créteil (UPEC), 61 avenue du Général de Gaulle, 94010 Créteil cedex 2, France*

^b *CIRAD-PRAM, Quartier Petite Morne, BP214, 97 285 Le Lamentin, Martinique*

* Corresponding author present address: Biodiversity and Ecosystem Function, UMR CNRS 7618 BIOEMCO, Ecole Normale Supérieure, 46 rue d'Ulm, 75230 Paris cedex 05- France

The nucleotide sequence data is registered in Genbank under the accession number JN858110

Summary

A full-length cDNA encoding a putative aspartic acid protease (*AcAPI*) was isolated from the flesh of *Ananas comosus*. The deduced sequence of *AcAPI* showed the common features of phytpepsins, the typical plant aspartic proteases, and phylogenetic analysis showed that *AcAPI* was closely related to plant aspartic acid proteases known to respond to abiotic stress. *AcAPI* expression under post-harvest chilling treatment was directly related to blackheart physiopathy resistance in two pineapple varieties differing in their susceptibility showed an up-regulation for MD2, the resistant variety, contrary to Smooth Cayenne susceptible. Results suggested that chilling stress triggered a higher transcript accumulation in MD2 variety, and maturation of the protein was also effective. Taken together the results suggest that *AcAPI* could be involved in postharvest chilling resistance and could be an effective molecular and biochemical marker for screening pineapple varieties resistant to blackheart physiopathy.

Key words: *Ananas comosus*, MD2, Smooth cayenne, blackheart physiopathy, chilling stress, phytpepsin, aspartic protease

Abbreviations: EDTA, ethylenediamine-tetraacetic acid; AP, aspartic acid protease; RACE, rapid amplification of cDNA ends; PSI, plant specific insert ; RT-qPCR, reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction.

Introduction

Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) represents approximately 25 % of the world tropical fruit production and the exportation trade of fresh pineapple is economically very important with 2.52 million tons in 2008 (Yacob 2010). Due to its perishable nature, exposure to chilling temperatures is a widely used procedure to extend the postharvest fruit quality during shipping exportation (Laville 1994). However, pineapple fruit is subject to chilling injury when submitted to low temperatures (Teisson 1972; Stewart *et al.* 2002; Raimbault *et al.* 2011). This injury is apparent by a physiological disorder known as blackheart that develops browning symptoms at the base of the fruitlets, near the core of the fruit (Teisson and Combres 1979; Paul and Rohrbach 1985; Swete Kelly and Bartholomew 1993; Zhou *et al.* 2003). Thus, blackheart physiopathy causes heavy economic losses to pineapple trade (Swete Kelly and Bagshaw. 1993; Ko *et al.* 2006).

Proteolysis in plants is known to play fundamental roles in developmental and physiological processes as well as protection against various stresses involving protein degradation, protein processing, maturation, protein turnover and mobilization (Callis *et al.* 1995; Vierstra *et al.* 1996; Grudkowska and Zagdanska 2004; Baek and Choi 2008; Van der Hoorn 2008). Few reports have focused on the response of proteolytic enzymes to low temperature stress (Schaffer and Fischer 1990; Montero *et al.* 1995; Uchikoba *et al.* 2003). However literature showed a common involvement of various endoproteases with an increase in gene expression and cellular proteolytic activities for cysteine proteases (Schaffer and Fischer 1990; Uchikoba *et al.* 2003; Simova-Stoilova *et al.* 2006 and 2010), serine proteases (Dramé *et al.* 2007; Golldack *et al.* 2003), and aspartic proteases (Cruz de Carvalho *et al.* 2001; Pena *et al.* 2006; Brunet *et al.* 2008; Contour-Ansel *et al.* 2010; Timotijevic *et al.* 2010). Previous results have shown the involvement of endoprotease in response to postharvest chilling stress in pineapple fruits (Raimbault *et al.* in press). Furthermore, a direct correlation between the gene expression of fruit bromelain cysteine protease and resistance to blackheart physiopathy has been shown (Raimbault *et al.* in press). Previous results also suggested that other proteases could be involved in blackheart physiopathy resistance/susceptibility.

Aspartic proteases APs (EC 3.4.23) are one of the four major classes of proteolytic enzymes (Barrett *et al.* 1999). APs are enzymes ubiquitously found in animals, plants, virus and bacteria (Davies 1990; Simoes and Faro 2004). Although their functions in plants remain mainly unresolved, they have been isolated from various plant tissues such as seeds, leaves, tubers and flowers (d'Hondt *et al.* 1993; Vieira *et al.* 2001; Simoes and Faro 2004; Contour Ansel *et al.* 2010). Aspartic acid proteases are synthesized as a single chain pre-pro-enzyme which is further processed into a mature two-chain enzyme. They are active at acidic pH and are specifically inhibited by pepstatin A (Davies 1990; Simoes and Faro 2004). In plants APs have been implicated in plant senescence (Domingos *et al.* 2000; Cruz de Carvalho *et al.*

2004; Milisavljevic *et al.* 2008), reproduction (Simoes and Faro 2004), program cell death (Panavas *et al.* 1999), and stress responses (Simoes and Faro 2004). They have been suggested to be involved in many abiotic and biotic stress such as pathogens, wounding, UV-B light, dark, heavy metals and drought (Schaller and Ryan 1996; Cruz de Carvalho *et al.* 2001; Cruz de Carvalho *et al.* 2004; Pena *et al.* 2006; Brunet *et al.* 2009; Contour-Ansel *et al.* 2010; Timotijevic *et al.* 2010). Furthermore, it has been shown that AP expression and activity could be correlated to drought stress severity and resistance degree of the plant cultivar (Cruz de Carvalho *et al.* 2001; Contour-Ansel *et al.* 2010).

The aim of the present work was to investigate the involvement of aspartic acid proteases in the resistance to post-harvest chilling stress as related to blackheart physiopathy development in pineapple fruits.

Materials and methods

Plant material and treatments

Pineapple fruits (*Ananas comosus* (L.) Merr) were harvested from an experimental station of a French International Center of Agricultural Research for Development (CIRAD), at Basse Pointe in Martinique. Two pineapple varieties were selected due to their resistance (MD2) and susceptibility (Smooth Cayenne, SC) to blackheart symptom development. Fruits were collected at commercial maturity stage and selected according to size and colour uniformity. They were washed with a sodium hypochlorite (100 ppm) solution in order to remove insects and maintain the fruit in pathogen free conditions. Selected fruits were either treated with 10 days at 10°C, then 10 days at 25°C to simulate Post-harvest Chilling Treatment conditions (PCT) or directly used as controls (c). After the post-harvest treatment the fruits were pilled and both the crown and top of the fruit removed. Flesh samples were cut at the base of the fruit near the core and were immediately flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until used.

Total RNA isolation

Frozen flesh material was ground with a mortar and pestle in liquid nitrogen and about 200 mg frozen flesh powder were used for total RNA extraction, using RNEasy Plant Minikit with a DNase treatment according to the manufacturer's instructions (Qiagen, France). Total RNAs were quantified with a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Starlab, USA) at 260 nm and integrity was checked by electrophoresis (1 % agarose gel).

Cloning of AcAPI

One pair of degenerate primers were designed from the highly conserved consensus regions using available monocotyledonous plant aspartic acid protease sequences from the GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), 5'-TGGCAGTTTGAYATGGGWGA-3' (forward primer) and 5'-TCACCMAGGATCCAGAGAGG-3' (reverse primer). The synthesis of cDNA was made from 1 µg of total RNA using the Omniscript® Reverse transcription kit (Qiagen). PCR experiments (Mastercycler, Eppendorf, France) were as followed: denaturation, 5 min at 95°C; 30-35 cycles: denaturation, 30 s at 94°C; annealing, 30 s at T_m: 58-60°C (depending on TM primer couple); extension, 60 s at 72°C (depending on sequence expected size); final extension, 10 min at 72°C. The PCR amplification products were cloned using the pGEM-T Easy Vector Plasmid System I (Promega, France) and inserted into the *E. coli* strain GT869 competent cells by heat shock. After selection of the recombinant bacteria, plasmid DNA was isolated using Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System kit (Promega, France). DNA Sequencing was performed on both strands by Genoscreen (Lille, France). To get the complete *AcAPI* cDNA, a Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) was performed using 5'/3'RACE 2nd Generation kit (Roche) according to manufacturers' instructions. RACE was carried out using 500 ng of total RNA from MD2 pineapple flesh and 2.5 U of Expand High Fidelity polymerase (Roche) in 50 µl of total volume.

Phylogenetic analysis

The nucleotide sequence of *AcAPI* was translated into protein sequence and compared using the molbio program (http://molbiol.edu.ru/eng/scripts/01_13.html). Sequence alignment was performed using ClustalW. The phylogenic tree was constructed using MUSCLE alignment and based on PhyML method (<http://www.phylogeny.fr>" www.phylogeny.fr).

Analyses of AcAPI gene expression by qRT-PCR

Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was conducted in a LightCyclerTM (Roche) using gene specific primers for *AcAPI*: 5'-TATGGATGCAGAACCAAATCAG-3' (forward), 5'-CCGACTTGAAGGATGTACTG-3' (reverse). Reactions were performed in a 10 µl volume containing 1µl of template cDNA, 1 µl of primer mix at 0.5 µM final concentration (forward and reverse primers) and 2 µl of SYBR®green master mix (Applied Biosystems). The final amount of cDNA template assayed was equivalent to 25 ng of RNA.

Three independent qPCR runs were performed as technical inter-run repetitions, with 3 intra-run replicates as biological repetitions, corresponding to three different samples of three fruits. Conditions for qPCR experiments were as followed: incubation, 10 min at 95°C, 1

cycle; and 30 cycles with 95°C for 15 s and 1 min at 59°C. Data was normalized using actin as a reference gene, selected due to its stability for flesh pineapple tissue, the two varieties MD2 and SC, and chilling postharvest treatment (Raimbault *et al.*, unpublished). A negative control containing water was used to validate the results.

Quantitative real-time PCR was performed according to the method of Pfaffl (2001). Relative expression was obtained by the equation (1):

$$((E_{\text{target}})^{\Delta C_{\text{ttarget}}(\text{control-sample})}) / ((E_{\text{ref}})^{\Delta C_{\text{tref}}(\text{control-sample})}) \quad (1)$$

Protein extraction and AcAP1 enzymatic activity assay

An acidic protein extract from pineapple flesh tissue was prepared by homogenizing 200 mg of frozen flesh powder with 1 ml of citrate buffer 50 mM at pH 4 containing 1 % PVP, 0.5 % β -mercaptoethanol, and 0.00125 % Triton X-100. Homogenate was mixed for 2 min by vortexing and was centrifuged at 14 000 x g for 20 min at 4°C (Himac, VWR, CT 15RE). Supernatant was collected and protein concentration was determined according to Bradford method (1976) using Biorad protein assay solution (Biorad).

The enzymatic assay mixture consisted of 50mM sodium acetate buffer (pH 4), 2 mM NaCl and 0.1 mM of the synthetic peptide substrat Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Phe(NO₂)-Ala-Leu (solubilized in DMSO). The enzymatic extract was pre-incubated at 37°C for 15 min and the rate of hydrolysis was monitored by measuring the absorbance at 300 nm at 37° C during 30 min in a plate reader spectrophotometer (Tecan, infinite ® M1000).

Results and Discussion

Cloning and characterization of the first pineapple aspartic acid protease, AcAP1

Using the degenerate primer set designed from the highly consensus regions of monocotyledonous plant APs, a unique cDNA fragment of 668 bp was amplified by PCR. The missing 5' and 3' extremities of pineapple AP were obtained by RACE procedures using specific primers from the sequenced fragment of the *Ananas comosus* aspartic acid protease (*AcAP1*). The full cDNA sequence obtained consisted of 1841 bp with 1545 bp open reading frame and 56 bp 5'-untranslated region (UTR) and 239 bp 3'UTR flanking it (Fig.1). The deduced AcAP1 protein consists of 514 amino acids residues with a predicted molecular mass

of 55.23 kDa and a calculated isoelectric point (pI) of 5.71 (http://us.expasy.org/cgi-bin/pi_tool; http://us.expasy.org/cgi-bin/pi_tool). AcAP1 shared 12 cysteine residues which could form 6 disulfide bridges. According to signalP 3.0, AcAP1 contained a signal peptide at 1-27 amino acids (Fig.2 and 3). This signal sequence was shown to be divided in 3 parts: an N terminal 1-7 (GAL), a H probe 8-19 (LHQ), and a C probe 20-27 (SAD). Analysis to EBML-EBI web site permitted to scan AcAP1 with the inter scanprosite program (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>; <http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>). It showed that AcAP1 has the aspartic acid protease family signature of pepsin A1 at 96-116; 242-255 and 487-502 amino acids position (Fig.2). It also revealed two saposin like type B domains at 322-356 and 386-423 amino acids position. A predicted transmembrane region was also localized at 1-25 amino acids position. The two aspartic acid residues belonging to the catalytic triad were detected at 105-116 and 292-303 amino acids position. Finally, two glycosylation sites were predicted at 257 (NHTY) and 405 (NQTQ) as well as several phosphorylation sites (Ser: 12; Thr: 3; Tyr: 5).

The present study reported the isolation of the first full-length AcAP1 cDNA in pineapple. Analysis of the full length AcAP1 cDNA (Fig.2) and alignment with other plant aspartic proteases (Fig.3) revealed that AcAP1 presents all the characteristic features of a typical aspartic acid protease phytepsin precursor (MEROPS ID A01.020).

```

caatacgcgaacccgctctccccgcggttgccgattcattaatgcagctggcagcaca 60
ggtttcccgaactggaaagcgggcagtgagcgcaacgcaattaatgtgagttagctcactc 120
attaggcaccgccaggtttacactttatgcttcgggctcgatgttggtggaattgtga 180
gcggataacaatttcacacaggaacagctatgaccatgattacgccaagctatattaggt 240
gacactatagaataactcaagctatgcatccaacgcgttgaggagctctcccatatggtcga 300
cctgcaggcgccgcgaattcactagtgattgaccacgcgtatcgatgtcgacttttttt 360
ttttttttgtt*caactccatttctctcgcgcatcgactctctcgcttcgatcgc 420
*
ggattccccaaatcgatctcgag 444
atcgaactcggggcggagctcttgcggtggcgatcctgctctcggtgctgttgcacag 504
M G T R G G A L A V A I L L S V L L H Q 20
tcgatcctcctcgctcgccgatggattggtgaggatcgggctgaagaagcggccgatc 564
S I L L A S A D G L V R I G L K K R P I 40
gatgagaacaacaggatcgcgcgcgctcggtgagaaggaggaggggccgctattggcg 624
D E N N R I A A R L V E K E E G P L L A 60
gcgagggtacgggctccgaggggcccctctcaaggaggggaggagacggacatcatc 684
A R R Y G L R G A P L K E G E E T D I I 80
gcgcttaagaactacatgaacgcccagctactttggggagatcgggatcggcacaccgcg 744
A L K N Y M N A Q Y F G E I G I G T P P 100
cagaagttcacggtgatcttcgataccgggagctccaacctctgggttccctcctcaag 804
Q K F T V I F D T G S S N L W V P S S K 120
tgctacttctcgattgcatgcttttccacacaaatacaagtcgggcccgatcaagctcc 864
C Y F S I A C L F H T K Y K S G R S S S 140
taccacaagaatgaaaaatctgcaagtattcactatggaactggagcaatttcaggcttt 924
Y H K N G K S A S I H Y G T G A I S G F 160
ttcacacagacacattgtaaaagttggtgaccttgggttaaaactcaggattttattgaa 984
F S T D H V K V G D L V V K T Q D F I E 180
gcaacaaaggagcccagcgttactttctggtggcaaaatttgatggatttcttgactt 1044
A T K E P S V T F V V A K F D G I L G L 200
ggatttcaagaaatctctgttgaaaatgctgttccagtggtgacaacatggtcgaccaa 1104
G F Q E I S V G N A V P V W Y N M V D Q 220
ggactcatcaaggagcctgtttctcttctggtttaaactgtaagctaacgacggggag 1164
G L I K E P V F S F W F N R N A N D G E 240
ggaggtgagatagtggtcgagggtgctgacctaatcattacaagggaaccatacatat 1224
G G E I V F G G A D P N H Y K G N H T Y 260
gttcagtgactcaaaaagggttattggcagtttgagatgggtgatgtcctcgttggtggc 1284
V P V T Q K G Y W Q F E M G D V L V G G 280
cagagcactggattctgcaatggaggtgtgcagcaatagcagattctggaacttctttg 1344
Q S T G F C N G G C A A I A D S G T S L 300
cttgctggtcccacgaccattatcgctgagattaaccagaaaattggagcttctggagtt 1404
L A G P T T I I A E I N Q K I G A S G V 320
gtgagccaggagtgcaaaagctgtgttgctgaatatggacaacagattctacaaatgttg 1464
V S Q E C K A V V A E Y G Q Q I L Q M L 340
cttcgagaggttcaaccagggaattctgctcaagtattggtctttgcacctttgatgtg 1524
L A E V Q P G K I C S S I G L C T F D G 360
aaacaaggagtcagtgccggaattgagagtggtgaacaaggacactcggagatctgcc 1584
K Q G V S A G I E S V V N K D T R R S A 380
gctggtctgagtgatgctatgtgcaatgtttgtgagatggcggtcgatggatgcagaa 1644
A G L S D A M C N V C E M A V V W M Q N 400
caaatcagccagaatcagacccaggagctcatatttaactacctcaaccagctatgcgag 1704
Q I S Q N Q T Q E L I F N Y L N Q L C E 420
aaactccctagccccatgggagagtcactgttgactgcagtagcgtggcctccatgcct 1764
K L P S P M G E S S V D C S S V A S M P 440
gatatctccttcacaattggtgggaaaaagttcagccctcaaaccagaacagctatgcgag 1824
D I S F T I G G K K F S L K P E Q Y I L 460
caagtcggcgagggtacgcgacagtcacagcgttcacggccttgacgtccct 1884
Q V G E G Y A A Q C I S G F T A L D V P 480
cctcctcgtggccctctctggatcttggtgatgtcttcagtgaggcttaccacactgtc 1944
P P R G P L W I L G D V F M G A Y H T V 500
ttcgactacggcaacatgagagtcgggttgcggatgcagcgtaa 1989
F D Y G N M R V G F A D A A * 515
accaggttacacactaccacactaccctatgcatatcgaaactttgaatttctggtttg 2049
gctttcacatgttttagtataaaaagcagccatgtatatataaaacataaagctggat 2109
ttagatgctttgcgttatcttagaggtcgactgcaaaagctccgtcgacagtttgtggtt 2169
ctcttttctgtaaaagttttatatgggcacagaaacaatatataacttaaaaaaaaaaaaaa 2229

```

Fig.1 Nucleotide sequences of *AcAPI* cDNA (GenBank accession no JN858110) and its deduced amino acid sequence. The stop codons at the 5'UTR and 3'UTR of *AcASP1* and the start codon were shown in box. The putative polyadenylation signal site is underlined.

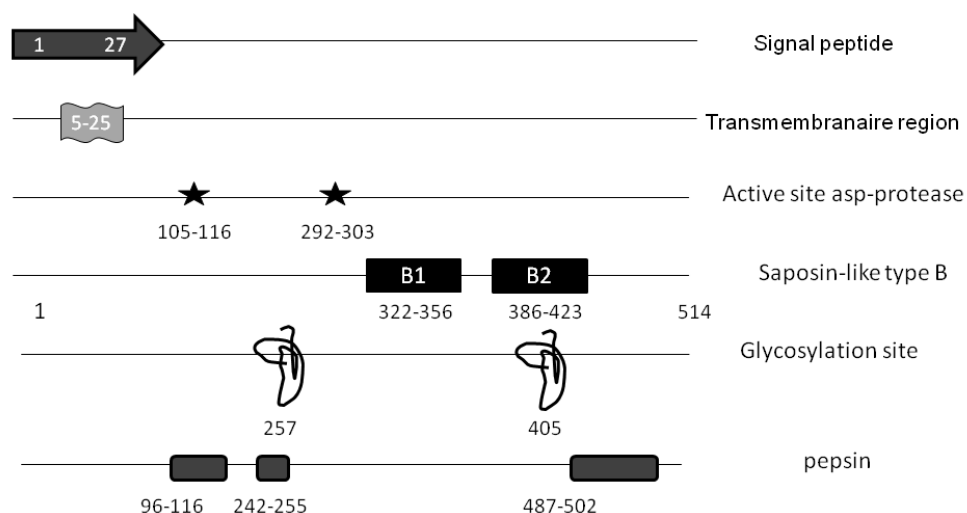


Fig. 2. Schematic representation of putative AcAP1.

It has a signal peptide of 27 amino acids, a prosegment containing Lys36 which is known to be important for the stability of the enzyme and for the correct alignment of the active-centre residues (Yada and Tanaka 2004). Lys11/Tyr13 known to be responsible for the ionic interaction with the Asp residues in plant APs, was not detected in AcAP1 suggesting a different mechanism of inactivation (Simoes and Faro 2004). The 2 aspartic acid residues (DTG and DSG) known to be the essential constituent of APs catalytic sites were identified (Fig. 2 and 3). AcAP1 has also the exclusive feature of plant APs which is a specific insert (plant specific insert, PSI) made of two saposin B like domains. The presence of PSI distinguishes typical from atypical APs, the last lacking this domain. Atypical plants APs include nucellin from barley (Chen and Foolad 1997), CDR1 from Arabidopsis (Xia *et al.* 2004) and FeAPL1 from buckwheat seeds (Milisavljevic *et al.* 2008). In typical plant APs, the PSI is partially or totally removed during protein processing for enzyme maturation so it does not seem to be needed for activity. Its function remains unclear but a role in vacuolar targeting of the precursor form has been suggested (Simoes and Faro 2004). The amino acid sequence of AcAP1 also revealed that it was composed of two N glycosylation sites and several phosphorylation sites. Differences were found between other reports which found 2, 3 or 4 N glycosylation site in distinct positions (Vieira *et al.* 2001; Milisavljevic *et al.* 2008; Contour Ansel *et al.* 2010). In AcAP1, the N glycosylation residues were found between the two catalytic residues of the catalytic site and in the PSI domain. This could influence the conformation of the protein, active site, stability and biological activity. Moreover it is known that N-glycans could protect the protein from proteolytic degradation and be responsible of the protein thermal stability (Lerouge *et al.* 1998).

	Signal peptide	Prosegment
ACN24614.1	MGKNNMVISWCLFVTLLLSAVSCAPNDGLRRIGLKKIKLDPNNRLAARIGSKD-DSFRA	59
AAQ14346.1	MGNKNVISLCLFVTLLLSAVSCAPNDGLRRIGLKKIKLDPNNRLAARIGSND-DSFRA	59
CAC86004.1	MGTTIKVVVLSLFISSLLFSVSVSNDGLVRIGLKKMKLDPNNRLAARLDSKDGALRA	60
AAB03108.1	MGIYSKTVLSSLIVSFLFLSASAERNDDGTFRVGLKKLKFDPRSRIAPVGSQKQLPLRG	60
BAA06876.1	MGTRSVALLVLAALLQALLP--ASAEEGLVRIALKKRPIDENSRAARLSGEEGARRLG	58
CAA39602.1	MGTRGLALALLAALLQTVLPAASEAEGLVRIALKKRPIDNRVATGLSGGE---EQF	57
AcASP1	MGTRGGALAVAILLSVLLHQSIILASADGLVRIGLKKRPIDENNRRIARLVEKEEGFLA	60
	** : : : * : * : * : * : * : * : * : *	
ACN24614.1	SIRKFHLQNNFGGTEDTIDVALKNYLDAQYFGEIAIGTSPQKFTVIEDTGSSNLWVPSL	119
AAQ14346.1	SIRKFHLQNNFAGTGETDIDVALKNYLDAQYGEISIGTSPQKFTVIEDTGSSNLWVPSSR	119
CAC86004.1	FIKKYFRNNLGDSEETDIDVALKNYMDAQYGEIGITPTQKFTVIEDTGSSNLWVSSRK	120
AAB03108.1	YG-----LGDSDGADIVTLKNYLDQYGEIAIGTTPPKFTVIEDTGSSNLWVPSK	110
BAA06876.1	LRGANS---LGGGGEGDIDVALKNYMNAQYFGEIGVTPPKFTVIEDTGSSNLWVPSAK	115
CAA39602.1	LLSGAN---PLRSEEGDIDVALKNYMNAQYFGEIGVTPPKFTVIEDTGSSNLWVPSAK	114
AcASP1	ARRYGLRGAPLKEGEETDIALKNYMDAQYFGEIGITPTQKFTVIEDTGSSNLWVGSSK	120
	: * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
ACN24614.1	CTFSVACYFHAKYRSSKSTYKNGTAAAIQYGTGAISGFFSYDSVRVGDIVVKSQEFIE	179
AAQ14346.1	CTFSIACYFHAKYRSGRSSTYRRNGTAAAIQYGTGAISGFFSYDNVRVGDIVVKNQEFIE	179
CAC86004.1	CYFSVACYFHAKYKASDSSTYKDKGPASIQYGTGAISGFFSYDHVQVGDIVVVDQEFIE	180
AAB03108.1	CYFSIACLFHAKYKSSRSSTYKNGKSAIHYGTGAISGFFSNDVATVGDIVVVDQEFIE	170
BAA06876.1	CYFSIACFFHSRYKSGSSSTYKNGKPAAIQYGTGSIAGFFSSEDSVTVDIVVVDQEFIE	175
CAA39602.1	CYFSIACLYHSRYKAGASSTYKNGKPAAIQYGTGSIAGFFSSEDSVTVDIVVVDQEFIE	174
AcASP1	CYFSIACLFHTKYKSGRSSSYHNGKSAIHYGTGAISGFFSTDHVKVGDIVVVDQEFIE	180
	* * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
ACN24614.1	ATREPGVVFLAAKFDGILGLGFQEIISVGNAPVWYNMVEQGLIKEPVFSFWFNRPKEEEE	239
AAQ14346.1	ATREPGVVFLAAKFDGILGLGFQEIISVGNAPVWYNMVEQGLIKEPVFSFWFNRPKEEEE	239
CAC86004.1	ATKEPGLTFMVAKFDGILGLGFKEISVGDAVPVWYNMVKGLIKEPVFSFWFNRPDEEA	240
AAB03108.1	ATKEPGITFVLAKFDGILGLGFQEIISVGNAPVWYNMVKGLIKEPVFSFWFNRPDEEE	230
BAA06876.1	ATKEPGLTFMVAKFDGILGLGFQEIISVGDAVPVWYNMVEQGLVSEPVFSFWFNRPDEGE	235
CAA39602.1	ATKEPGITFVLAKFDGILGLGFKEISVGKAVPVWYNMVEQGLVSDPVFSFWFNRPDEGE	234
AcASP1	ATKEPSVTFVVAKFDGILGLGFQEIISVGNAPVWYNMVDQGLIKEPVFSFWFNRPNDGE	240
	** : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
ACN24614.1	GGEIVFGGVDPAHYKKGHTYVPVTRKGYWQFMDGDLVIGGKPTGYCAGCAAIADSGTSL	299
AAQ14346.1	GGELVFGGVDPAHYKKGHTYVPVTRKGYWQFMDGDLVIGGKPTGYCAGGCAAIADSGTSL	299
CAC86004.1	GGEIVFGGVDPNHYKKGHTYVPVTRKGYWQFMDGDLVIGGKPTGYCAGSAAIADSGTSL	300
AAB03108.1	GGELVFGGVDPNHYKKGHTYVPVTRKGYWQFMDGDLVIGGAPTYCESGCAAIADSGTSL	290
BAA06876.1	GGEIVFGGMDPSHYKGNHTYVPVTRKGYWQFMDGDLVIGGKPTGYCAGSAAIADSGTSL	295
CAA39602.1	GGEIIFGGMDPKHYVGEHTYVPVTRKGYWQFMDGDLVIGGKSTGYCAGGCAAIADSGTSL	294
AcASP1	GGEIVFGGADPNHYKGNHTYVPVTRKGYWQFMDGDLVIGGQSTGYCNGGCAAIADSGTSL	300
	** : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
Plant specific insert		
ACN24614.1	LAGPTTIITMINHAIGAAGTMSQECKTVVAEYGGQITLNLLEAETQPKKICQIGLCTFDG	359
AAQ14346.1	LAGPTAIITMINHAIGAAGTMSQECKTVVAEYGGQITLNLLEAETQPKKICQIGLCTFDG	359
CAC86004.1	LAGPSTVITMINHAIGATGVVSQECKAVVQYGRITIDLLAEAQPKKICQIGLCTFDG	360
AAB03108.1	LAGPTTVITMINHAIGAAGVVSQCKIIVVDQYGGQITLNLLEAETQPKKICQIGLCTFDG	350
BAA06876.1	LAGPTAIITEINEKIGAAGVVSQECKTVVSQYGGQITLNLLEAETQPKKICQIGLCTFDG	355
CAA39602.1	LAGPTAIITEINEKIGAAGVVSQECKTVVSQYGGQITLNLLEAETQPKKICQIGLCTFDG	354
AcASP1	LAGPTTIIAEINQKIGASGVVSQECKAVVAEYGGQITLNLLEAETQPKKICQIGLCTFDG	360
	** : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
ACN24614.1	TRGIDMGIASVVDIEARKSSGGLHDAACSACEMAVVWMQNQLSRNQTDQILSYVNLCD	419
AAQ14346.1	TRGVDMGIESVVDENARKSSGGLHDAACSACEMAVVWMQNQLSRNQTDQILSYVNLCD	419
CAC86004.1	AHGVSTGIESVVDENSGKSSGVLDAACPCACEMAVVWMQNQVRNQTDQILSYVNLCD	420
AAB03108.1	KRGVSMGIESVVDENKNAKSSGVLDAACPCACEMAVVWMQISQLRQNTQERILDYINDLCE	410
BAA06876.1	KHGVSAKISVVDDEAGESNGLSGPMCNACEMAVVWMQNQLAQNTQDLILNYINQLCN	415
CAA39602.1	TRGVSAKISVVDDEPVKSNGLRADPMCSACEMAVVWMQNQLAQNTQDLILNYINQLCN	414
AcASP1	KQGVSAKIESVVDKTRRSAAGLSDAMCNVCEMAVVMQNQISQNTQELIFNYINQLCE	420
	: * : * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
ACN24614.1	KMPSPMGESSIDRGNISLPPVVSFTIGGRTFDLLPEEYILKVGEGPVAQCISGFTALDIP	479
AAQ14346.1	KMPSPMGESSVCGDISSLPVVSFTIGGRTFDLLPEEYILKVGEGPVAQCISGFTALDIA	479
CAC86004.1	RVNPMGESAVDCGLSSMPTISFTIGGKVFDLTPPEYILKVGEGSEACISGFTALDIP	480
AAB03108.1	RLSPMGESAVDCQLSTMPVSLTIGGKVFDLTPPEYILKVGEGPAAQCISGFTALDVA	470
BAA06876.1	KLSPMGESSVDCGLSLASMPESFTIGAKKFKALPEEYILKVGEGAAQCISGFTALDIP	475
CAA39602.1	RLSPMGESAVDCGLSGMPDIEFTIGGKKFKALPEEYILKVGEGAAQCISGFTALDIP	474
AcASP1	KLSPMGESSVDCSSVASMPDISFTIGGKKFSLKPEYILQVGEYAAQCISGFTALDVP	480
	: * : * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
ACN24614.1	PPRGPLWILGDVFMGRYHTVDFDGNLRVGFADAA	513
AAQ14346.1	PPRGPLWILGDVFMGPYHTVDFDGNLRVGFADAA	513
CAC86004.1	PPRGPLWILGDIFMGRYHTVDFDGLRVGFADAA	514
AAB03108.1	PPRGPLWILGDVFMGKYHTVDFDGLRVGFADAA	504
BAA06876.1	PPRGPLWILGDVFMGAYHTVDFDGLRVGFADAA	509
CAA39602.1	PPRGPLWILGDVFMGPYHTVDFDGLRVGFADAA	508
AcASP1	PPRGPLWILGDVFMGAYHTVDFDGNLRVGFADAA	514
	***** : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	

Fig. 3. Sequence alignment of the putative AcAP1 with other plant aspartic proteases. Sequences were aligned using the ClustalW software (<http://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>). AcAP1 (*Ananas comosus*): JN858110; ACN24614.1: *Phaseolus vulgaris*; AAQ14346: *Vigna unguiculata*; CAC86004.1: *Theobroma cacao*; AAB03108: *Brassica napus*; BAA06876.1: *Oryza sativa*; CAA39602.1: *Hordeum vulgare*.

Phylogeny of AcAP1

A blast search (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) revealed that the deduced pineapple aspartic acid protease AcAP1 shared high identity with other monocotyledonous plant aspartic proteases including 76 % identity for *Oryza sativa* (D32144.1), 75 % identity for *Zea mays* (NM_001155310.1) and 74 % identity for *Triticum aestivum* (AB219968.1). The deduced pineapple aspartic acid protease AcAP1 amino acid sequence and the sequences of other plant aspartic proteases were aligned after blast by MUSCLE, and the phylogenetic tree was constructed by the maximum likelihood PhyML method. Aspartic acid proteases were split into 2 major branches, A and B (Fig. 4). The A branch was split further into 3 groups. The first group showed that AcAP1 was closely related to monocotyledonous plants in particular *Oryza sativa* (NP_001043786.1) as previously suggested a blast analyse with a higher % identity of AcAP1 and two monocotyledonous plant *Zea mays* and *Oryza sativa*. The second and third groups contained only dicotyledonous plant APs. The second group included an aspartic protease from *Fagopyrum esculentum* leaves (AAV84085) which is known to be expressed in response to various abiotic stress (Timotijevic *et al.* 2010) and a digestive aspartic protease *Nepenthes alata* (from a carnivorous plant). Finally branch B included the IV group which included plant aspartic proteases known to be involved in senescence (*Vigna unguiculata* AAB03843.2); program cell death (soybean BAB628901); and water stress (*Phaseolus vulgaris* ACN24614.1).

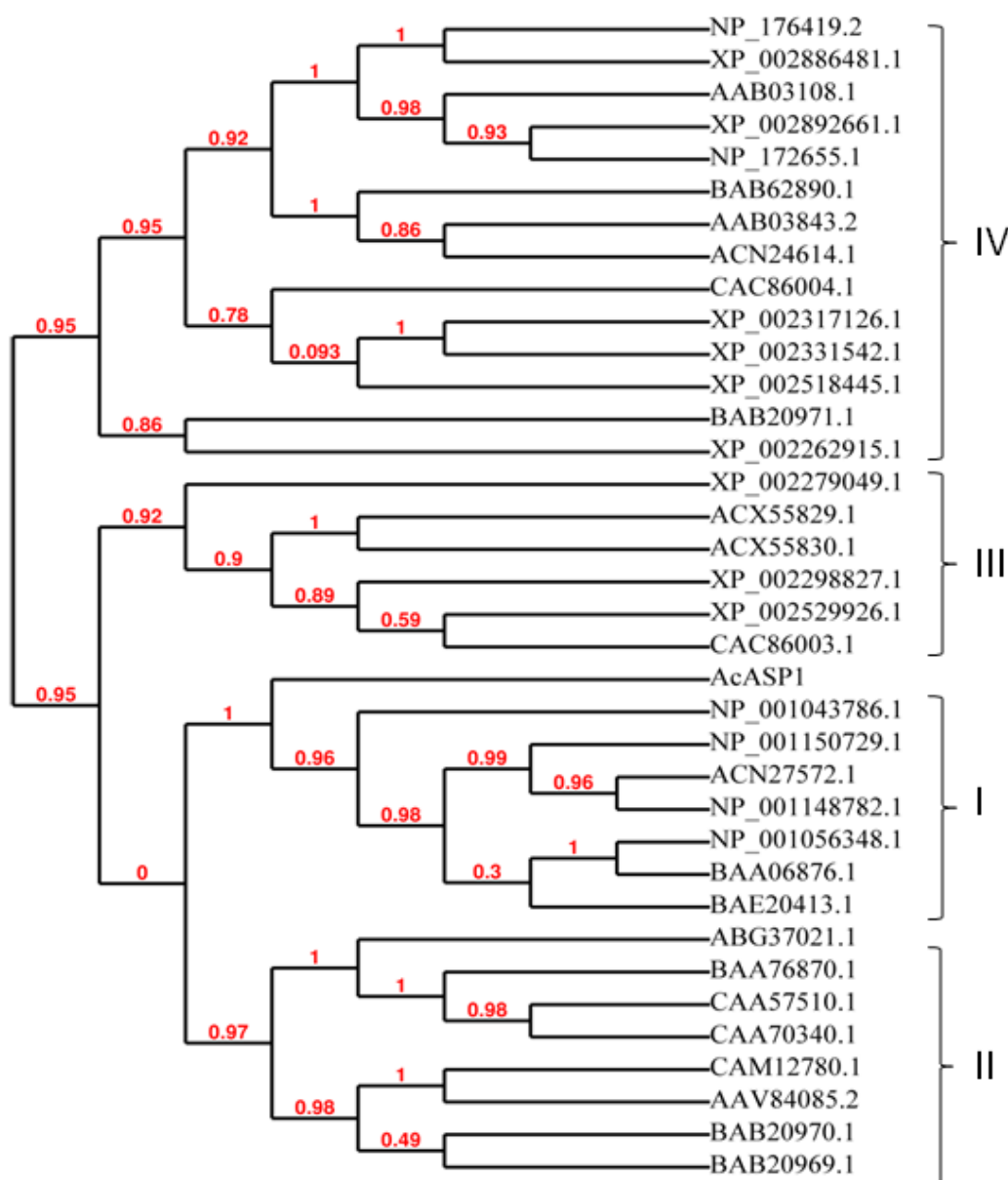


Fig.4 Phylogenetical analysis of plant aspartic acid proteases. The amino acid sequences were aligned with MUSCLE and analyzed by the PhyML method (www.phylogeny.fr). The red numbers correspond to percentage of 1000 bootstraps. *Arabidopsis lyrata*, XP_002892661.1, XP_002886481.1; *Arabidopsis thaliana*, NP_172655.1, NP_176419.2; *Ananas comosus*, JN858110; *Brassica napus*, AAB03108.1; *Castanea mollissima*, ACX55829.1, ACX55830.1; *Centaurea calcitrapa*, CAA70340.1; *Cynara cardunculus*, CAA57510.1; *Glycine max*, BAB62890.1; *Fagopyrum esculentum*, CAM12780.1, AAV84085.2; *Helianthus annuus*, BAA76870.1; *Nepenthes alata*, BAB20970.1, BAB20969.1, BAB20971.1; *Nicotiana tabacum*, ABG37021.1; *Oryza sativa*, NP_001056348.1, NP_001043786.1, BAA06876.1; *Phaseolus vulgaris*, ACN24614.1; *Populus trichocarpa*, XP_002298827.1, XP_002317126.1, XP_002331542.1; *Ricinus communis*, XP_002529926.1, XP_002518445.1; *Theobroma cacao*, CAC86003.1, CAC86004.1; *Triticum aestivum*, BAE20413.1; *Vigna unguiculata*, AAB03843.2; *Vitis vinifera*, XP_002279049.1, XP_002262915.1; *Zea mays*, ACN27572.1, NP_001148782.1, NP_001150729.1.

Gene expression of *AcAPI* in pineapple fruits submitted to postharvest chilling stress

Expression analysis of *AcAPI* in two pineapple varieties differing in their susceptibility to blackheart development submitted or not to postharvest chilling stress was carried out using real time PCR. The transcript level of *AcAPI* in the resistant MD2 variety was 3 fold higher in fruits submitted to chilling stress than in control fruits (Fig.5).

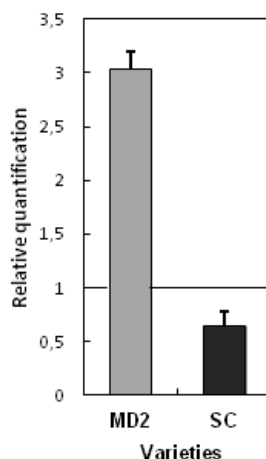


Fig. 5. Real-time qPCR expression analysis of *AcAPI* under postharvest chilling treatment in two pineapple varieties differing in their susceptibility to blackheart development, MD2 (resistant) and Smooth Cayenne (SC) (susceptible). Results were obtained using the Pfaffl (2001) equation and the actin gene as an internal control. Data are the mean \pm SD of three independent experiments.

This indicates a clear up-regulation of *AcAPI* gene expression in the MD2 variety under postharvest chilling stress. This is in agreement with other reports that have shown an up-regulation of aspartic acid proteases in response to various abiotic stresses such as wounding in tomato (Schaller and Ryan 1996), dark, drought, UV-light, wounding, and salicylic acid in buckwheat (Timotijevic *et al.* 2010) and drought stress in common bean (Cruz de Carvalho *et al.* 2001; Contour-Ansel *et al.* 2011). Interestingly, the SC variety showed a lower expression level of *AcAPI*, about 37 % fold in fruit submitted to postharvest chilling stress. The trend in the susceptible variety was opposite to the resistant variety with a slight down regulation of the *AcAPI* gene expression in SC submitted to postharvest chilling stress (Fig.5). *AcAPI* presented significant differences in the pattern of expression in the two pineapple varieties, MD2 and SC, submitted to postharvest chilling stress. Increased expression of the *AcAPI* gene was detected in resistant MD2 contrary to susceptible SC. This suggests that *AcAPI* gene expression is directly correlated to pineapple blackheart resistance. In drought tolerant cowpea, AP is constitutively expressed while it is up-regulated in drought susceptible common bean cultivars (Cruz de Carvalho *et al.* 2001). In the case of pineapple fruit, we could suggest a protective role of aspartic acid protease to postharvest chilling stress hence

contributing to MD2 resistance to blackheart symptom development. Plant aspartic acid proteases still have no assigned biological function but results gathered by the present work together with previous reports support an active role under stress conditions. APs could be involved in maintaining cellular homeostasis by preventing the over-accumulation of stress damaged proteins and contributing to intracellular protein turnover increasing the amino acid pool for the synthesis of specific defense related proteins.

Enzymatic analyses

Pineapple fruits were subjected to chilling postharvest stress in order to investigate aspartic protease activity under blackheart physiopathy development. Using a specific substrate for APs different patterns of aspartic acid protease activities were detected and these were related to pineapple variety (Fig. 6).

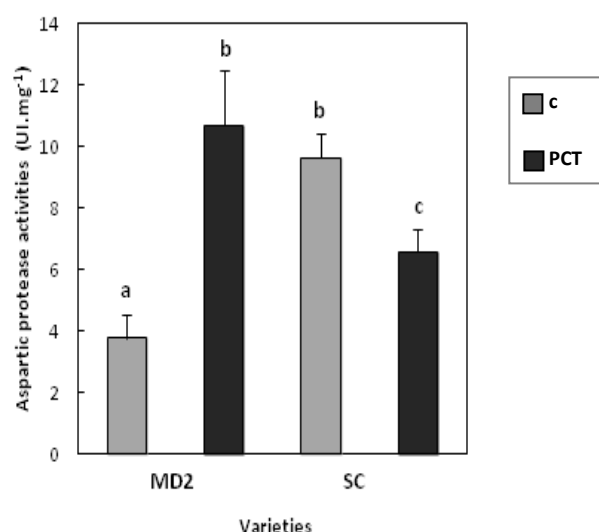


Fig. 6. Aspartic acid protease activities under postharvest chilling treatment in two varieties of pineapple differing in their susceptibility to blackheart, MD2 (resistant) and Smooth Cayenne (SC) (susceptible), submitted to postharvest chilling treatment (PCT) or not (c). Data are the mean \pm SD of three independent experiments. Statistically significant differences are indicated by different letters (Tukey test $p < 0.05$).

In control conditions the susceptible SC variety showed a 2.5 fold higher aspartic protease activity than the resistant MD2. However, when the fruits were submitted to chilling postharvest stress, MD2 showed a greater increase in AP activity (3 fold). An opposite trend was seen in the SC variety with a 2.5 fold decrease in AP activity under postharvest chilling treatment. These results were consistent with those obtained on *AcAPI* gene expression. Results are also in agreement with those obtained on *PvAPI* from *Phaseolus vulgaris* leaves during water stress (Contour-Ansel *et al.* 2010) and with those obtained by wounding stress on potato leaves (Guevara *et al.* 2001). Chilling stress conditions triggered a rise of aspartic

protease activity in the resistant MD2, in contrast, the susceptible SC showed a decrease of aspartic protease activity (Fig.6). Hence AP activity can also be directly correlated to the pineapple degree of resistance to blackheart symptom development.

Conclusion

In the present study the isolation and characterization of the first pineapple aspartic protease, *AcAP1*, was made. To our knowledge, this is the first time that an investigation has focused on the involvement of a plant aspartic protease in chilling stress resistance. Results showed that the aspartic acid protease response was variety dependant. Furthermore, the AP response which was transcriptional and post-transcriptional regulated, could be directly related to resistance to blackheart physiopathy. Taken together our results suggest that *AcAP1* could have an important protective role against postharvest chilling stress.

Acknowledgements

The authors wish to thank Sandrine Chantepie for technical assistance.

References

- Baek KH, Choi D. Roles of plants proteases in pathogen defense. *Plant Pathol J* 2008; 24(4): 367-374.
- Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF. *Handbook of Proteolytic Enzymes*, 2nd ed. Elsevier Acad. Press, Amsterdam, 2004. p 3-4.
- Brunet J, Varrault G, Zuily-Fodil Y, Repellin A. Accumulation of lead in the roots of grass pea (*Lathyrus sativus* L.) plants triggers systemic variation in gene expression in the shoots. *Chemosphere* 2009; 77: 113-1120.
- Callis J. Regulation of protein degradation in plants. *Genet Eng* 1997; 19: 121-48.
- Chen F, Foolad M. Molecular organization of a gene in barley which encodes a protein similar to aspartic proteinase and its specific expression in nucellar cells during degeneration. *Plant Mol Biol* 1997; 35: 821-31.
- Chen J, Ouyang Y, Wang L, Xie W, Zhang Q. Aspartic proteases gene family in rice : gene structure and expression, predicted protein features and phylogenetic relation. *Gene* 2009; 442: 108-118.
- Cruz de Carvalho MH, D'Arcy-Lameta A, Roy-Macauley H, Gareil M, El Maarouf H, Pham-Thi AT, Zuily-Fodil Y. Aspartic protease in leaves of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.): enzymatic activity, gene expression and relation to

drought susceptibility, FEBS Lett 2001; 492: 242-46.

Cruz de Carvalho MH, Pham-Thi AT, Gareil M, D'Arcy-Lameta A, Zuily-Fodil Y. Isolation and characterization of an aspartic proteinase gene from cowpea (*Vigna unguiculata* L Walp). J Plant Physiol 2004; 161: 971-76.

Contour-Ansel D, Torres-Franklin ML, Zuily-Fodil Y, Cruz de Carvalho MH (2010) An aspartic acid protease from common bean is expressed 'on call' during water stress and early recovery. J Plant Physiol 2010; 167(18): 1606-12.

Davies DR. The structure and function of the aspartic proteinases. Annu Rev Biophys Chem 1990; 19: 189-15.

Demirevska K, Simova-Stoilova L, Vassileva V, Vasev, I, Grigorova B, Feller U. Drought-induced leaf protein alterations in sensitive and tolerant wheat varieties. Gen Appl Plant Physiol 2008; 34(1-2): 79-102.

Domingos A, Cardoso PC, Xue ZT, Clemente A, Brodelius PE, Pais MS. Purification, cloning and autoproteolytic processing of an aspartic proteinase from *Centaurea calcitrapa*. FEBS 2000; 267: 6824-31.

Dramé NK, Clavel D, Repellin A, Passaquet C, Zuily Fodil Y. Water deficit induces variation in expression of stress-responsive genes in two peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars with different tolerance to drought. Plant Physiol Biochem 2007; 45 (3-4): 236-43.

Golldack D, Vera P, Dietz KJ. Expression of subtilisin-like serine proteases in *Arabidopsis thaliana* is cell-specific and responds to jasmonic acid and heavy metals with developmental differences. Physiol Plantarum 2008; 118: 64-73.

Goudarzi M, Pakniyat H. Salinity causes increase in proline and protein contents and peroxidase activity in wheat cultivars. J Applied Sci 2009; 9: 348-353.

Grudkowska M, Zagdańska B. Multifunctional role of plant cysteine proteinases. Acta Biochem Polonica 2004; 51(3): 609-24.

Guevara MG, Daelo GR, Oliva CR. Purification and characterization of an aspartic protease from potato leaves. Physiol Plantarum 2001; 112: 321-26.

Hieng B, Ugrinovic K, Sustar-Vozlic J, Kidric M. Different classes of proteases are involved in the response to drought of *Phaseolus vulgaris* L cultivars differing in sensitivity. J Plant Physiol 2004; 161: 519-30.

Ko HL, Campbell MP, Jobin-Décor MP, Eccleston KL, Graham MW, Smith MK. The Introduction of Transgenes to Control Blackheart in Pineapple (*Ananas Comosus* L.) cv. Smooth Cayenne by Microprojectile Bombardment. Euphytica 2006; 150: 387-395.

Laville E. La protection des fruits tropicaux après récolte. CIRAD-COLEACP Tec & Doc-Lavoisier 1994; p13.

- Milisavljevic M, Timotijevic G, Radovic S, Konstantinovic M, Maksimovic V. Two types of aspartic proteinases from buckwheat seed – genes structure and expression analysis. *J Plant Physiol* 2008; 165: 983-90.
- Montero LM, Escribano MI, De La Plaza JL, Merodio C. Chilling temperature storage induces changes in protein patterns and protease activity in cherimoya fruit. *Postharvest Biol Technol* 1995; 5: 251-60.
- Mutlu A, Gal S. Plant aspartic proteinase: enzymes on the way to a function. *Physiol Plant* 1999; 105: 569–76.
- Panavas T, Pikula A, Reid PD, Rubinstein B, Walker EL. Identification of senescence-associated genes from daylily petals. *Plant Mol Biol* 1999; 40: 237-48.
- Parida AK, Das AB, Mitra B, Mohanty P. Salt-stress induced alterations in protein profile and protease activity in the mangrove (*Bruguiera parviflora*). *Z. Naturforsch* 2004; 59: 408-14.
- Parida AK, Das AB. Salt tolerance and salinity effects on plants: A review. *Ecotox Environ Safety* 2005a; 60: 324-349.
- Parida AK, Mitra B, Das AB, Das TK, Mohanty P. High salinity reduces the content of a highly abundant 23 kDa protein of the mangrove (*Bruguiera parviflora*). *Planta* 2005b; 221: 135-140.
- Paull RE, Rohrbach K G. Symptom development of chilling injury in pineapple fruit (*Ananas comosus*). *J American Society for Horticultural Science* 1985; 110: 100-5.
- Pena LB, Tomaro ML, Gallego SM. Effect of different metals on protease activity in sunflower cotyledons. *Elect J Biotechnol* 2006; 9: 258-62.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Oxford Univ Press Nucleic Acids Res* 2001; 29: 2002-70.
- Raimbault AK, Marie-Alphonsine PA, Horry JP, Francois-Haugrin M, Romuald K, Soler A. “Polyphenol Oxidases and Peroxidases Expression in Four Pineapple Varieties (*Ananas comosus* L.) after a Chilling Injury.” *J Agricultural and Food Chemistry* 2011; 59(2): 342-8.
- Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* 2010; 38: D227–33.
- Roy-Macauley H, Zuily-Fodil Y, Kidric M, Pham Thi AT, Viera de Silva J. Effect of drought stress on proteolytic activities in *Phaseolus* and *Vigna* leaves from sensitive and resistant plants. *Physiol Plantarum* 1992; 85(1): 90–96.
- Schaffer M A, Fischer RL .Transcriptional Activation by Heat and Cold of a Thiol Protease Gene in Tomato. *Plant Physiol* 1990; 93(4): 1486-91.
- Schaller A, Ryan. Molecular cloning of a tomato leaf cDNA encoding an aspartic protease, a

systemic wound response protein. *Plant Mol Biol* 1996; 31: 1073-77.

Simões I, Faro C. Structure and function of plant aspartic proteinases. *Eur J Biochem* 2004; 271: 2067-75.

Simova-Stoilova L, Vassileva V, Petrova T, Tsenov N, Demirevska K, Feller U. Proteolytic activity in wheat leaves during drought stress and recovery. *Gen Appl Plant Physiol* 2006; 91-100.

Simova-Soilova L. Proteolytic activity and cysteine protease expression in wheat leaves under severe soil drought and recovery. *Plant Phys. Biochem* 2010; 48(2-3): 200.

Stewart RJ, Sawyer BJB, Robinson SP. Black heart development following chilling in fruit of susceptible and resistant pineapple cultivars. *Australian J Experimental Agriculture* 2002; 42: 195-9.

Swete Kelly DE, Bagshaw J. Effect of fruit handling and fruit coatings on blackheart (internal brown spot) and other aspects of fresh pineapple quality. In: Bartholomew DP, Rohrbach KG, editors. *Acta Hort (ISHS)*, USA: Honolulu; 1993, p 305-16.

Swete Kelly, D., Bartholomew, D.P. Pineapple pests and disorders. In: Broadley RH, Wassaman RE, Sinclair E, editors. *Other Disorders. Acta Hort (ISHS)*, QDPI: Brisbane; 1993, p 455-58.

Teisson C. Studies on internal browning of pineapple. *Fruits* 1972; 27(9): 603-612.

Teisson C, Combres JC. Le brunissement interne de l'ananas. III. Symptomatologie. *Fruits* 1979; 34(5): 315-329.

Timotijevic GS, Milisavljevic MD, Radovic SR, Konstantinovic MM, Maksimovic VR. Ubiquitous aspartic proteinase as an actor in the stress response in buckwheat. *J Plant Physiol* 2010; 167: 61-68.

Uchikoba T, Fukumoto S, Onjo M, Okubo M, Arima K, Yonezawa H. The development of cysteine proteases in freesia corms during responses to chilling. *J Thermal Biol* 2003. 28(8): 555-62.

Van der Hoorn RAL. Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms. *Ann Rev Plant Biol* 2008; 59: 191-223.

Vierstra RD. Proteolysis in plants: mechanisms and functions. *Plant Mol Biol* 1996; 32: 275-302.

Vieira M, Pissarra J, Verissimo P, Castanheira P, Costa Y, Pires E, *et al.* Molecular cloning and characterization of cDNA encoding cardosin B, an aspartic proteinase accumulating extracellularly in the transmitting tissue of *Cynara cardunculus L.* *Plant Mol Biol* 2001; 45: 529-39.

Wang J, Li X, Liu Y, Zhao X. Salt stress induces programmed cell death in *Thellungiella halophila* suspension-cultured cells. *J Plant Physiol* 2010; 167: 1145-51.

Xia Y, Suzuki H, Borevitz J, Blount J, Guo Z, Patel K, *et al.* An extracellular aspartic protease functions in Arabidopsis disease resistance signaling. *EMBO J* 2004; 2: 980-8.

Yacob A. Global overview and trade of the pineapple industry. Abstracts of the 7th International Pineapple Symposium. July 13-15 2010 at Johor Baru, Malaysia. Issue No. 17 Addendum to Newsletter Pineapple Working Group of the I.S.H.S. 2010; 37p.

Zhou Y, Dahler JM, Underhill SJR, Wills RBH. Enzymes associated with blackheart development in pineapple fruit. *Food Chem* 2003; 80: 565-572.

Zuily-Fodil Y, Vasquez Tello A, Vieira da Silva J. Effect of water deficit on cell permeability and on chloroplast integrity. *Bull Soc Bot de France* 1990; 137: 115-123.

Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L, Gruissem W. Genevestigator. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol* 2004; 136: 2621-2632.

CHAPITRE 4

Projet d'article n° 4 :

**Etude préalable de l'implication de l'ascorbate peroxidase et de la
phenylalanine ammonia-lyase dans le brunissement interne
de l'ananas et mise au point d'outils moléculaires**

Ce travail est un projet d'article portant sur l'ascorbate peroxydase APX et sur la phénylalanine ammonia-lyase PAL en réponse au traitement de post-récolte (TPR) induisant le BI chez l'ananas. Il s'agit de résultats préliminaires qu'il conviendra de compléter.

Les expériences présentées dans le chapitre I ont montré une différence variétale de la réponse des ananas au traitement de post-récolte (TPR) au niveau des symptômes développés et des efflux d'électrolytes observables sur la chair des fruits atteints ou non par le BI. Ce premier chapitre nous a permis de distinguer différentes variétés d'ananas sensibles au BI telles que les variétés Flh41, Flh53 et Smooth Cayenne (SC) avec différents symptômes de BI, et a confirmé la résistance de la variété MD2 au BI, avec une résistance des membranes cellulaires et une absence de symptômes au sein des fruits soumis au traitement de post-récolte (TPR).

Le chapitre II nous a permis de tester ces variétés vis-à-vis d'enzymes couramment impliquées dans le brunissement des végétaux comme la polyphénol oxydase PPO et la guaiacol peroxydase POD. Cette dernière étant également une enzyme anti-radicalaire. Au cours des travaux du chapitre II, il apparaît que l'activité enzymatique de la guaiacol peroxydase est inhibée chez l'ensemble des variétés testées, après un traitement en post-récolte (TPR). Ces résultats conduisent à s'interroger sur l'implication des enzymes anti-radicalaires et leur rôle dans le BI de l'ananas. De plus la PPO lors de son contact avec son substrat phénolique, transforme celui-ci en quinone qui subit ensuite des réactions secondaires donnant une couleur brune à la chair des fruits. L'évidente nécessité de la disponibilité du substrat phénolique conduit à l'étude de l'activité de la phénylalanine ammonia-lyase PAL, enzyme clé de la voie de synthèse des phénylpropanoïdes dans le mécanisme de BI.

Les objectifs de cette étude sont de déterminer l'implication de la phénylalanine ammonia-lyase PAL et de l'ascorbate peroxydase APX par l'analyse de l'expression des deux gènes et, l'étude des activités enzymatiques des enzymes correspondantes.

Expérimentation

Différentes variétés d'ananas ont été utilisées : la variété MD2, résistante au BI ; et les variétés Flh41, Flh53 et Smooth Cayenne (SC), sensibles au BI.

Chaque variété a fait l'objet d'un traitement en post-récolte (TPR) : 10 jours à 9°C puis 10 jours à 25°C ; et d'un traitement au froid en continu de 10 jours à 9°C (F). Les témoins correspondent : aux fruits fraîchement cueillis (T_0), et aux fruits sénescents conservés 20 jours à 25°C (T_{20}).

Principaux résultats

La sénescence des fruits induit une inhibition de l'activité enzymatique de la PAL. Au contraire le froid en continu (F) stimule l'activité enzymatique chez les variétés MD2 et SC, qui est très élevée chez SC. Le traitement en post-récolte (TPR) ne modifie pas les activités de la PAL chez les fruits frais et traités dans le cas des variétés MD2, Flh41 et SC. Par contre l'activité PAL diminue chez la variété Flh53.

L'activité enzymatique de l'APX est très faible chez les variétés MD2, Flh53 et Flh41 traités au froid en continu (F). Au contraire elle est très stimulée chez les fruits de la variété SC. Le traitement au froid en post-récolte (TPR) n'induit pas de changements de l'activité chez les variétés MD2, SC et Flh41 par rapport au témoin (fruits frais).

Enfin, les fruits des variétés MD2 et SC soumis à un froid en post-récolte (TPR) présentent une inhibition nette de l'expression du gène de l'APX.

Conclusions

Nos résultats confirment l'implication de la PAL et de l'APX dans le BI de l'ananas et plus particulièrement pendant la période de froid du traitement post-récolte. Un phénomène de reprise apparaît lors du retour des fruits à température ambiante pour les activités PAL et APX, confirmant que le traitement au froid est approprié pour réduire la sénescence des fruits. La variété sensible SC présente des activités enzymatiques PAL et APX élevées pendant la période de froid en continu. Ces données pourraient être corrélées à la sensibilité au BI et à l'intensité du brunissement de la chair de cette variété.

Etude préalable de l'implication de l'ascorbate peroxydase et de la phénylalanine ammonia-lyase dans le brunissement interne de l'ananas et mise au point d'outils moléculaires

Résumé

Afin d'analyser le rôle de l'ascorbate peroxydase (APX), et de la phénylalanine ammonia-lyase (PAL) dans le brunissement interne (BI) de l'ananas, quatre variétés d'ananas (*Ananas comosus*. (L) Merr.) MD2, Smooth Cayenne (SC), Flh41 et Flh53 (hybrides) ont été utilisées. Elles ont été traitées au froid : soit 10 jours à 9°C (F), soit en post-récolte (TPR) : 10 jours à 9°C puis 10 jours à 25°C. Les résultats ont été comparés à deux témoins correspondant à des fruits fraîchement cueillis (T_0) et à des fruits sénescents conservés 20 jours à 25°C (T_{20}).

Les activités enzymatiques de la PAL et de l'APX ont été mesurées. Des amorces du gène codant l'APX ont été réalisées et ont permis d'analyser l'expression du gène en réponse au froid en post-récolte (TPR).

Les résultats montrent que lorsque les fruits sont soumis au froid en continu (F) ou au traitement post-récolte (TPR), les activités enzymatiques de la PAL et de l'APX ainsi que l'expression du gène correspondant sont affectés. L'activité enzymatique de la PAL chute lorsque les fruits sont sénescents. Elle est stimulée par le froid en continu (F) pour les variétés MD2 et SC, par contre elle est inhibée chez les hybrides. En réponse au traitement en post-récolte (TPR), seule la variété Flh53 présente une inhibition de l'activité de la PAL. En ce qui concerne les variétés MD2, SC et Flh41, l'activité de la PAL après traitement en post-récolte (TPR) est voisine de celle des fruits fraîchement cueillis (T_0). Il semblerait qu'un phénomène de « reprise » puisse avoir lieu.

L'activité enzymatique de l'APX est très faible chez les variétés MD2, Flh53 et Flh41 traités au froid en continu (F). Au contraire elle est très stimulée chez les fruits de la variété SC. Le traitement en post-récolte (TPR) montre une activité de l'APX semblable à celle des fruits fraîchement cueillis (T_0) chez les variétés MD2, SC et Flh41.

Mots clés : *Ananas comosus*, brunissement interne, variétés, froid, post-récolte

Abréviations: BI, brunissement interne ; PAL, phénylalanine ammonia-lyase ; APX, ascorbate peroxydase ; Smooth Cayenne, SC ; froid en continu, F ; froid en post-récolte, TPR ; fruits fraîchement cueillis, T₀ ; fruits sénescents de 20 jours, T₂₀ ;

Introduction

Les fruits tropicaux comme l'ananas sont des denrées très fragiles et périssables qui nécessitent d'être consommées rapidement après récolte. Une technique classique pour ralentir la dégradation des fruits transportés par bateau consiste à traiter les fruits au froid (Laville. 1994). Or les fruits tropicaux comme la banane, la mangue, la goyave, les agrumes et les ananas sont sensibles au froid. Dans le cas des ananas, un traitement à 9°C puis à 25°C induit un brunissement interne (BI) de la chair des fruits appelé encore cœur noir (Teisson. 1972; Teisson *et al.*, 1979a; Stewart *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2003a).

Des études ont montré l'implication de la phénylalanine ammonia-lyase (PAL) en réponse aux contraintes biotiques et abiotiques (Dixon et Paiva. 1995 ; Campos *et al.*, 2004). Il semble que la PAL, enzyme clé dans la voie des phénylpropanoïdes, puisse agir comme agent protecteur et soit impliquée dans la résistance des plantes au froid. De plus, elle participe à l'apport de substrats pour les enzymes responsables du brunissement des végétaux (Macheix *et al.*, 2005), notamment la polyphénol oxydase PPO dont l'implication dans le brunissement de la chair des ananas a été démontrée (Teisson *et al.*, 1979a; Paull et Rohrbach. 1985; Stewart *et al.*, 2001 ; Zhou *et al.*, 2003a ; Raimbault *et al.*, 2011).

Une sur-production d'espèces activées de l'oxygène EAO, est observable lorsque les plantes sont soumises aux contraintes abiotiques comme l'excès de sel (Miller *et al.*, 2010), le déficit hydrique (Cruz de Carvalho. 2008), les métaux lourds et le froid (Gill et Tuteja. 2010). Les EAO interviennent dans les voies de signalisation en réponse aux stimuli environnementaux et permettent la régulation de gènes intervenant dans la résistance des plantes. Pourtant à forte concentration les EAO sont délétères et altèrent les macromolécules (lipides, protéines, carbohydrates, ADN) pour conduire au stress oxydatif (Gill et Tuteja. 2010). Les EAO sont inactivées par les enzymes anti-radicalaires : la guaiacol peroxydase (POD, EC 1.11.1.7), l'ascorbate peroxydase (APX, EC 1.11.1.11), la catalase (CAT, EC 1.11.1.6), la superoxyde dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) et par des éléments antioxydants comme les vitamines A, C, E, le glutathion et différents pigments (carotène, zéaxanthine, xanthophylle).

Ce travail est destiné à étudier les effets du froid sur la production de phénols via la PAL et son implication dans le BI. Nous avons mesuré l'activité enzymatique de l'APX et l'expression d'un gène codant l'APX, une des principales enzymes anti-radicalaire constituant le système de défense des plantes vis-à-vis EAO. Notre objectif est de mieux comprendre l'implication de la PAL et de l'APX dans le BI, et leur éventuelle implication dans les phénomènes de sensibilité au BI des variétés d'ananas.

1 Matériel et méthodes

1.1 Traitements des fruits

Les ananas des variétés Flh53, Flh41, Smooth Cayenne (SC) et MD2 ont été récoltés à Basse Pointe (Martinique) dans une station de recherche du Centre de Coopération Internationale de Recherche Agronomique (CIRAD). Les conditions de culture sont les mêmes que celles précédemment décrites (Raimbault *et al.*, 2011). Les variétés SC, Flh41 et Flh53 sont sensibles au BI, tandis que la variété MD2 est résistante. Les fruits ont été récoltés au stade de maturité déterminé par les critères cités dans le chapitre 1. Les fruits ont été nettoyés, traités avec de l'hypochlorite de sodium (0,01 %).

Les fruits ont été soumis à deux types de traitements au froid : 10 jours à 9°C (F), ou 10 jours à 9°C puis 10 jours à 25°C (TPR). Les témoins correspondent aux fruits fraîchement récoltés (T_0) ou sénescents (20 jours à 25°C) : T_{20} .

Après traitements les fruits sont débarrassés de leur couronne, la peau est enlevée et la partie supérieure des fruits est éliminée. Les fruits sont rapidement découpés, plongés dans de l'azote, puis sont conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

1.2 Extraction des ARN totaux

Les échantillons sont broyés en poudre fine dans de l'azote liquide à l'aide d'un mortier et d'un pilon. Les ARN totaux ont été extraits deux fois avec le kit RNeasy plant mini kit (Qiagen) en utilisant 200 mg de poudre d'ananas. Ils ont été également traités à la DNase selon les instructions du fournisseur. La quantité d'ARN a été mesurée par spectrophotométrie pour $A_{\lambda 260 \text{ nm}}$ (Nanodrop, ND1000). La pureté et l'intégrité des ARN ont été évaluées par le rapport $A_{\lambda 260/280 \text{ nm}}$ et par migration des ARN sur gel d'agarose à 1 % (Mupid ® one).

1.3 Obtention et clonage d'ADNc partiels

Des amorces spécifiques pour l'actine (contig 42), préalablement choisis comme gène de référence (article2) et pour l'APX ont été réalisées en utilisant le logiciel de sélection d'amorces PrimerPy (<http://code.google.com/p/oligobench/wiki/PrimerPy>) (Tableau 1). La séquence de l'actine a été obtenue dans une banque de données Australienne (<http://www.pgcl.com.au>; Moyle *et al.*, 2005). Des amorces spécifiques ont été dessinées pour quatre nouveaux gènes d'ananas codant APX, CAT, GST et la PAL en réalisant une stratégie basée sur l'alignement de séquences multiples de monocotylédones comme le riz et le maïs obtenues dans la base de données GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) et la recherche de zones consensus à l'aide du logiciel d'alignement multiple Clustalw (http://www.infobiogen.fr/services/analyse/cgi-bin/clustalw_in.pl).

La synthèse ADNc a été obtenue à partir de 1 µg d'ARN totaux en utilisant le kit Omniscript® Reverse transcription kit (Qiagen) selon les instructions du fournisseur. Les réactions de polymérisation en chaîne PCR (Mastercycler, Eppendorf, France), ont été réalisées avec le programme suivant : dénaturation 5 min à 95°C; 30-35 cycles: dénaturation, 30 s à 94°C; hybridation, 30 s à Tm°: 56-62°C (selon les couples d'amorces); extension, 30 – 120 s à 72°C (selon la taille des séquences à obtenir); extension finale, 10 min à 72°C. Les amplicons ont été clonés en utilisant le vecteur pGEM-T Easy System I (Promega, France) et ils ont été insérés par choc thermique dans les bactéries compétentes *E.coli* souche GT869. Après sélection des bactéries recombinées, l'ADN plasmidien a été isolé en utilisant un kit de purification de l'ADN, Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System kit (Promega, France). L'ADN a été séquencé par Genoscreen (Lille, France). Les séquences partielles obtenues ont été enregistrées dans GenBank: APX (GU266541), GST (GU266542), CAT (GU266543) et PAL (GU266544).

Tableau 1 : Amorces spécifiques pour les gènes codant l'APX et l'actine (gène de référence)

Couple d'amorces			
N° accession du gène	Sens	Antisens	Taille de l'amplicon (pb)
APX (GU266541)	GGTCTTGTCTCCCTTCC	CCAATAACGGACTCGACATC	150
Actine (Contig 42)	GTGGCACTTGACTTTGAGCA	CTTCCTGATATCCGACATCGC	170

1.4 Activité enzymatique spécifique de l'ascorbate peroxydase (APX)

L'extraction des protéines est réalisée avec 50 g de pulpe de fruit, dans 20 ml de tampon phosphate à 0,2 M (pH 6,8), additionné de PVP 2 %, NaCl 0,38 M, d'acide ascorbique 0,5 mM. Le broyat est filtré et lavé avec 20 ml de tampon phosphate à 0,2 M (pH 6,8) contenant NaCl 0,46 M. Le filtrat est centrifugé à 14 000 x g pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant est ensuite précipité par du sulfate d'ammonium à 30 %, puis à 90 %.

Les mesures enzymatiques ont été réalisées sur des extraits préalablement dialysés avec du tampon phosphate 0,2 M (pH 6,8). La mesure d'activité des échantillons a été réalisée avec 2,45 ml de tampon phosphate 0,05 M (pH 6,8), contenant 145 µl acide ascorbique 0,5 mM, 300 µl H₂O₂ 0,5 mM, auxquels sont ajoutés 200 µl d'extrait protéique. La mesure de l'activité de l'APX a été réalisée en suivant l'oxydation de l'ascorbate par le peroxyde d'hydrogène à $A_{420 \text{ nm}}$. L'activité spécifique (AS) de l'APX est exprimée en $\Delta A_{420 \text{ nm}} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prot}^{-1}$.

1.5 Activité enzymatique spécifique de la phénylalanine ammonia-lyase (PAL)

L'extraction des protéines a été réalisée avec 10 g de pulpe de fruit, 15 ml de tampon borate à 0,1 M (pH 8,8) contenant : acide ascorbique 5 mM, EDTA 2 mM, PVP 1 %. Le broyat a été filtré, puis centrifugé à 14 000 x g pendant 20 minutes à 4°C. Le surnageant a été additionné de sulfate de protamine 1 % sous agitation douce pendant 10 min à 4°C. Après centrifugation à 13 000 x g pendant 10 min à 4°C, le surnageant a été conservé à 4°C pour les mesures d'activités enzymatiques.

La mesure d'activité spécifique de la PAL a été réalisée selon la méthode décrite par [Zhou et al. \(2003a\)](#) avec quelques modifications. 2,75 ml de tampon borate à 0,1 M (pH 8,8) additionné de L-phenylalanine 60 mM a été préincubé à 40°C pendant 15 minutes. Puis 0,5 ml d'extraits ont été ajoutés. Le mélange a été incubé à 40°C pendant 1h et la réaction a été stoppée par ajout de 500 µl d'HCl 6 N. L'acide cinnamique libéré est dosé à $A_{290 \text{ nm}}$. L'activité spécifique (AS) de la PAL est exprimée en $\Delta A_{290 \text{ nm}} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg prot}^{-1}$.

2 Résultats

2.1 Activités enzymatiques spécifique de la PAL

Chez les témoins (T₀) l'activité de la PAL diffère selon les variétés. L'activité la plus faible est enregistrée pour MD2 (AS = 0,94) tandis que la variété SC présente une activité élevée

(AS = 1,42). En ce qui concerne les hybrides, les valeurs obtenues sont voisines pour Flh41 et MD2 d'une part et Flh53 et SC d'autre part (Figure 1).

Les fruits sénescents (T_{20}), après 20 jours à 25°C présentent dans tout les cas une inhibition de l'activité de la PAL de 85, 51, 64 et 84 % respectivement pour MD2, SC, Flh41 et Flh53 (Figure 1).

Un traitement au froid en continu (F) induit chez les variétés MD2 et SC une très nette stimulation de l'activité PAL ($\times 1,7$ et $\times 1,9$ respectivement). Les hybrides Flh41 et Flh53 présentent au contraire une inhibition de l'activité enzymatique (Figure 1).

Le traitement de post-récolte TPR (9°C puis 25°C) conduit à une situation équivalente aux témoins excepté pour la variété Flh53. Ceci indique que les variétés MD2, SC, et Flh41 sont capables de « reprise » : après une inhibition de l'activité PAL due au froid (F), les fruits remis à température ambiante (25°C) retrouvent des niveaux d'activité de la PAL voisins de ceux des témoins fraîchement cueillis (T_0).

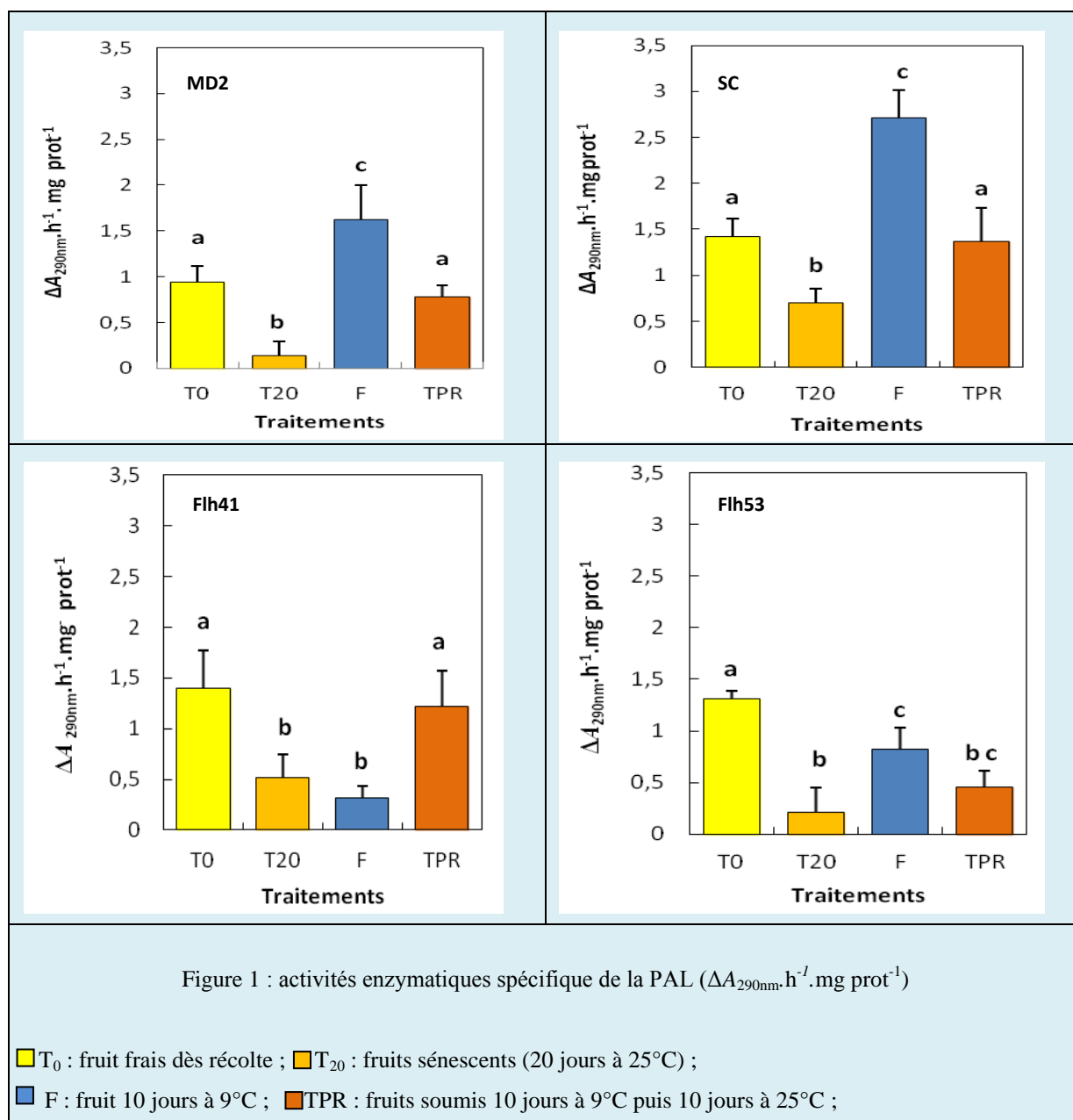
2.2 Activités enzymatiques spécifique de l'APX

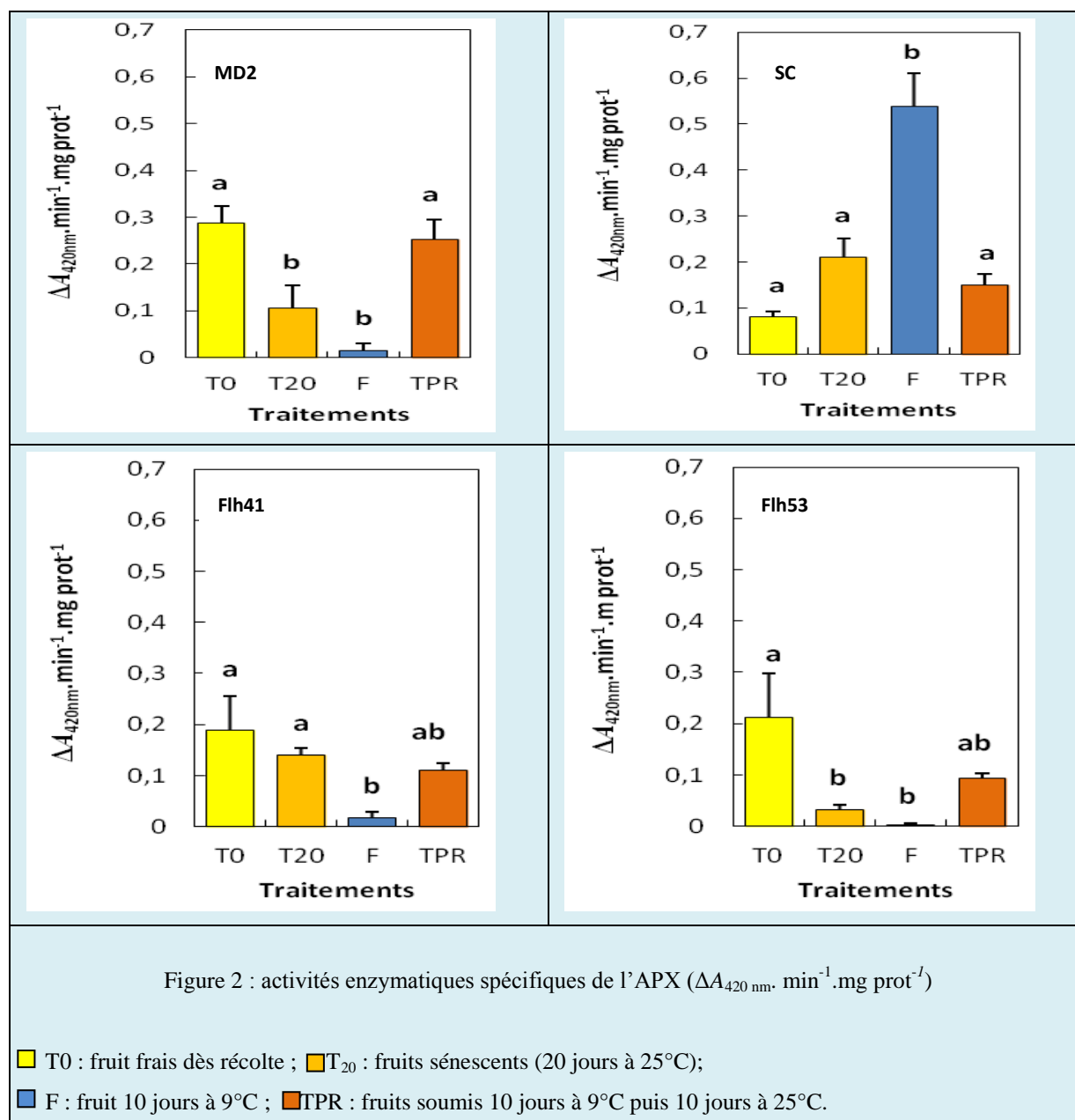
En ce qui concerne les témoins (T_0), l'activité APX est plus élevée chez les variétés MD2, Flh53 et Flh41 (AS = 0,287, 0,212 et 0,18 respectivement), alors que SC présente une activité APX très faible (AS = 0,08) (Figure 2).

Les fruits sénescents (T_{20}), après 20 jours à 25°C présentent une inhibition de l'activité de l'APX chez les variétés MD2 et Flh53 de 65 % et 86 % respectivement. Les fruits sénescents chez les variétés SC et Flh41 présentent au contraire une activité enzymatique constante.

Le froid (F) inhibe fortement les activités APX chez les variétés MD2, Flh41 et Flh53 tandis que la variété SC présente une activité 6,7 fois plus élevée que celle des témoins (Figure 2).

Lors du traitement de post-récolte (TPR), les variétés présentent dans tout les cas des activités APX voisines de celles des ananas fraîchement cueillis (T_0). Ceci indique que les variétés MD2, SC, Flh41 et Flh53 sont également capables de « reprise » dans le cas des activités APX.





2.3 Expression du gène codant une APX

L'expression du gène codant l'APX est importante dans les fruits fraîchement cueillis (T_0), et voisine chez les variétés MD2 et SC (Figure 3).

En réponse au traitement de post-récolte (TPR), une inhibition de l'expression du gène APX est observée dans les deux cas (Figure 3).

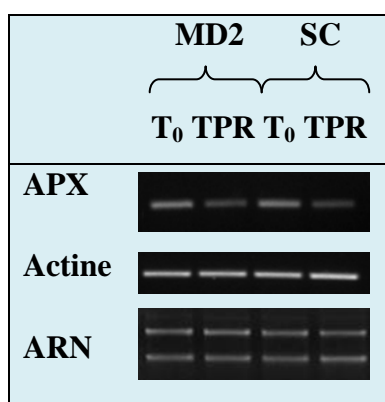


Figure 3 : Réponse du gène codant une APX au traitement post-récolte (TPR) chez 2 variétés d'ananas MD2 et SC. L'actine a été utilisée comme gène de référence et les ARN totaux ont été déposés pour s'assurer de leur intégrité.

3 Discussion

Cette étude a pour but d'analyser la réponse de quatre variétés d'ananas différant par leur degré de sensibilité au froid. Quatre situations ont été étudiées : fruits fraîchement cueillis T_0 , sénescents T_{20} , soumis au froid (9°C, 10 jours) F et soumis au traitement de post-récolte TPR (9°C, 10 jours puis 25°C, 10 jours).

Les analyses ont été menées dans le cas d'une enzyme impliquée dans la synthèse des phénols, la phénylalanine ammonia-lyase (PAL) et d'une enzyme anti-radicalaire l'ascorbate peroxydase (APX).

Par rapport aux témoins, l'activité de la PAL est inhibée en réponse à la sénescence (T_{20}) chez l'ensemble des variétés. Un résultat similaire a été obtenu chez la variété Smooth Cayenne (SC) (Zhou *et al.*, 2003a).

Par contre l'activité de la PAL est stimulée par le froid chez les variétés MD2 et SC. La variété sensible Smooth Cayenne (SC) étant plus affectée que la variété résistante MD2. En

réponse aux contraintes abiotiques comme le froid, l'activité PAL est souvent stimulée (Dixon et Paiva, 1995 ; Sanchez-Balesta *et al.*, 2000). Ainsi la mesure de l'activité de la PAL est-elle souvent utilisée comme marqueur de réponse aux contraintes environnementales chez les plantes (Sanchez-Balesta *et al.*, 2000). De même, une accumulation de transcrits et de protéines de la PAL ont été observées pendant la conservation de fruits au froid chez la banane (Chen *et al.*, 2008). Chez l'ananas une étude menée avec des températures de 6°C, 13°C et 18°C pour la conservation de la variété Cayenne lisse (SC) a montré également une augmentation de l'activité PAL (Zhou *et al.*, 2003a). Nos résultats indiquent que le froid a un effet sur l'activité enzymatique de la PAL des ananas, qui diffère en fonction des variétés : la variété résistante au BI, MD2 est particulièrement sensible à la sénescence.

Il faut noter que le traitement de post-récolte (9°C puis 25°C) TPR, est particulièrement efficace puisqu'à l'issue du traitement, les fruits présentent la même activité PAL que les fruits témoins fraîchement cueillis.

En ce qui concerne la réponse anti-radicalaire, l'activité de l'APX, est inhibée en réponse à la sénescence chez les variétés MD2 et Flh53, alors qu'elle reste plus ou moins constante chez les variétés SC et Flh41. Par contre le froid induit une stimulation nette de l'activité de l'APX chez la variété sensible SC. Au contraire elle est fortement inhibée chez les autres variétés. Cette stimulation de l'activité APX chez la variété SC peut être mise en relation avec un moyen de défense de la variété pour lutter contre une production élevée d'EAO. Des études ont montré que le froid induit une sur-production d'EAO dans ces conditions (Gill et Tuteja, 2010).

Dans le cas du traitement de post-récolte (9°C puis 25°C) TPR, l'activité APX aboutit à une situation proche de celle des témoins. Nos résultats s'opposent à ceux de Zhou *et col.* (2003a) qui ont observés une diminution de l'activité APX en réponse au froid en post-récolte chez la variété Smooth Cayenne (SC).

En ce qui concerne l'expression du gène codant cette APX, une étude préliminaire montre qu'elle est légèrement diminuée chez les deux variétés MD2 et SC. D'autres études plus précises par qPCR sont envisagées pour caractériser le comportement des gènes cibles de la séquence (codant au cours de la sénescence T₂₀, le froid F, l'alternance froid/chaud TPR).

Conclusion

Les résultats obtenus dans le cas de la PAL (à l'origine du brunissement) et de l'APX (anti-radicalaire) montrent que le traitement post-récolte est efficace pour maintenir les fruits dans un état voisin des témoins fraîchement cueillis.

Cette étude préliminaire comprend également le clonage d'un ADNc partiel codant la PAL afin d'étudier par qPCR l'expression du gène (n° GU266544). Cet outil pourrait permettre de mieux comprendre le rôle de la PAL dans l'accumulation de phénols dans les tissus atteints par le BI notamment pendant la période de froid en continu. D'autres outils moléculaires ont été obtenus, correspondant à des ADNc partiels des gènes codants la glutathione S transferase GST (n°GU266542) et la catalase CAT (n°GU266543). Cette étude devra donc être poursuivie par l'étude en qPCR de l'expression fine des gènes codant la PAL et les enzymes anti-radicalaires APX, GST et CAT au cours des quatre conditions expérimentales sélectionnées, et ceci dans le cas des variétés MD2 résistante et SC sensible dont les réponses sont nettes contrairement à celle des hybrides.

Discussion

Conclusions

Perspectives

DISCUSSION GÉNÉRALE

L'ananas est un fruit non-climactérique qui doit être récolté mûr, prêt à être consommé. Cependant, dès la récolte, le fruit entre en sénescence, d'où la nécessité de ralentir ce processus par un traitement au froid visant à conserver les qualités organoleptiques des ananas exportés par bateau. Cependant ce traitement est problématique puisque les températures basses déclenchent au champ mais également en post-récolte un désordre physiologique : le brunissement interne de l'ananas (BI).

Ce travail a porté sur la comparaison entre l'état physiologique d'ananas frais et celui d'ananas ayant subi un traitement de post-récolte (TPR) : de 10 jours à 9°C et 10 jours à 25°C, correspondant au transport des fruits (10°C), puis à leur mise en vente (25°C). Les objectifs de cette étude étaient de parvenir à une meilleure connaissance de la physiologie du brunissement interne de l'ananas dans le but de caractériser des marqueurs biochimiques et moléculaires de la résistance de l'ananas au BI, en vue de les utiliser dans des programmes d'amélioration variétale de l'ananas pour la résistance au traitement de post-récolte.

Sélection des critères de maturité des ananas

L'étude de l'ananas en post-récolte se heurte à de nombreux écueils. En effet il est indispensable de tenir compte de la variabilité des symptômes selon la saison de la récolte des fruits. Les fruits récoltés au mois de novembre sont beaucoup plus atteints par le BI que ceux récoltés au mois de janvier, bien que les variétés et les traitements soient les mêmes (données non présentées). Les données disponibles indiquent en effet, que les symptômes de BI varient selon les saisons : un fort rayonnement solaire, une amplitude thermique journalière élevée et une faible pluviométrie sont propices au développement du BI (Teisson et Combres. 1979).

L'échantillonnage des fruits au champ s'est révélé complexe, une homogénéité de maturité et de taille des fruits étant requise pour éviter tout biais dans les paramètres de l'étude. Une forte hétérogénéité de la maturité de fruits issus d'un même champ a été observée, bien que l'induction florale ait été réalisée au même moment. Ceci pourrait être attribué non seulement à une différence de robustesse des propagules lors de leur plantation mais également à leur potentiel génétique. De plus les fruits matures sont plus sensibles au BI que des fruits sur-

mûrs, bien que de petits fruits sur-mûrs peuvent également présenter d'intenses symptômes de BI (Teisson et Combres. 1979).

Dans le chapitre 1, l'accent a été mis sur un calibrage des critères permettant de sélectionner des fruits de maturité homogène à la fois au champ et en laboratoire. Les critères de choix pour l'évaluation de la maturité des fruits ont été : l'aspect extérieur de la coloration, la période entre l'induction florale et la récolte, les qualités organoleptiques comme le taux de sucre supérieur à 12°, et un rapport sucre/acidité de l'ordre de 0,92 à 1,55, le parfum et l'absence de translucidité en coupe. Ces critères ont permis de sélectionner des fruits de maturité homogène pour l'ensemble de l'étude.

Le rôle des enzymes PPO, POD et PAL dans les symptômes de BI

Deux enzymes intervenants dans l'oxydation des phénols, la polyphénol oxydase (PPO) et les peroxydases (POD) participent au brunissement des végétaux (Macheix *et al.*, 2005) et des fruits tropicaux (Rinaldo *et al.*, 2010).

Notre étude a confirmé l'implication de la PPO dans le BI de l'ananas. En effet la variété résistante MD2 présente une très faible activité enzymatique, tandis que les variétés sensibles Flh41, Smooth Cayenne (SC) et Flh53 ont des activités PPO croissantes en réponse au froid en post-récolte (TPR). Ces résultats peuvent être corrélés avec l'observation de symptômes variables de BI selon les variétés : forte translucidité et peu de brunissement chez Flh41, fort brunissement chez SC, forte translucidité et brunissement chez Flh 53 et enfin absence de symptômes pour la variété résistante MD2. Ces résultats sont en accord avec des études menées sur la variété Smooth Cayenne (SC) sensible, pour laquelle l'activité enzymatique de la PPO est corrélée spatialement et temporellement avec le développement des symptômes de BI (Stewart *et al.*, 2001 et 2002 ; Zhou *et al.*, 2003a et b).

Lors de cette étude la démonstration a été faite de la présence d'au moins 6 isoformes de PPO chez les fruits des variétés sensibles en réponse au TPR. Le nombre d'isoformes et leur taille diffèrent suivant les variétés et peuvent constituer des éléments de reconnaissance propre à chacune. Jusqu'à présent seulement 2 gènes de PPO, PINPPO1 et PINPPO2 ont été identifiés (Stewart *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2003b). Ces isoformes de PPO pourraient refléter l'épissage alternatif d'un ou plusieurs gènes, et/ou pourraient être issus de gènes non encore identifiés chez l'ananas.

D'après nos résultats le traitement de post-récolte (TPR) induit une inhibition de l'activité guaiacol peroxydase (POD) chez l'ensemble des variétés. D'autres études ont montré que la POD est impliquée dans le BI de l'ananas (Paull et Rohrbach. 1985; Van Lelyveld *et al.*, 1991; Selvarajah *et al.*, 2000; Weerahewa et Adikaram. 2005). Plus de 7 isoformes anioniques et cationiques ont été mises en évidence pour cette enzyme. Les formes anioniques étant plus nombreuses et réactives. Dans le cas de nos travaux la comparaison des POD anioniques selon les variétés et le traitement au froid n'ont pas permis de distinguer une isoforme particulière impliquée dans la réponse de l'ananas au froid en post-récolte.

Les activités enzymatiques de la PPO et POD diffèrent selon les variétés, chez les variétés sensibles au BI, l'activité de la guaiacol peroxydase diminue tandis que celle de la PPO augmente. On observe donc une déconnection de l'activité synergique de ces enzymes qui transforment les phénols en quinones, lesquelles subissent des réactions secondaires non enzymatiques responsables du brunissement, comme une polymérisation, ou encore une interaction avec des composés (acides aminés, protéines, amine) (Mayer. 1987; Macheix *et al.*, 2005).

En ce qui concerne la phénylalanine ammonia-lyase (PAL), enzyme clé dans la voie de synthèse des phénylpropanoïdes (Jones. 1984), nos résultats montrent une reprise chez les fruits soumis au froid en post-récolte (TPR). En réponse au froid seul, son activité est très importante chez la variété Smooth Cayenne (SC) sensible au BI. Ce résultat est en accord avec celui de Zhou *et col.* (2003a). Ils sont cohérents avec d'autres résultats d'après lesquels le froid provoque une accumulation de transcrits et une augmentation de l'activité enzymatique de la PAL dans des tissus de différentes plantes (Chen *et al.*, 2008).

Les produits phénoliques synthétisés pendant la période de froid continu (10 jours à 9°C) du traitement post-récolte (TPR), constituent les substrats potentiels pour la PPO dont l'activité enzymatique est par ailleurs très importante chez les variétés sensibles Flh41, Flh53 et Smooth Cayenne (SC), en réponse au TPR.

Il est important de souligner que la majorité des substrats phénoliques se trouvent dans la vacuole, isolés des PPO essentiellement membranaires situées au niveau des membranes des thylacoïdes (Toivonen et Brummell. 2008 ; Macheix *et al.*, 2005). Dès lors nous pouvons nous interroger sur le rôle des membranes dans le BI de l'ananas.

Le rôle des membranes dans le BI

Lorsque les végétaux sont soumis aux contraintes environnementales comme le froid, les membranes cellulaires sont les premières cibles (Lyons. 1973, Vasquez-Tello *et al.*, 1990). Le froid modifie la structure, la composition lipidique et les fonctions des membranes (Lyons. 1973; Wolf. 1978 ; Sevillano *et al.*, 2009). Ces modifications déclenchent une série de réactions secondaires conduisant à une perturbation des échanges membranaires et à une perte d'intégrité des membranes (Sevillano *et al.*, 2009). Celle-ci peut être mise en évidence au moyen du test des « dommages membranaires relatifs » basé sur les efflux d'électrolytes cellulaires chez les plantes (Vasquez-Tello *et al.*, 1990) et les fruits (Weerahewa et Adikaram. 1995).

Afin d'évaluer l'état des membranes cellulaires lors du BI, quatre variétés d'ananas ont été sélectionnées : MD2, Flh41, Flh53 et SC. Celles-ci présentent des symptômes de BI, différant en intensité et en aspect. La variété MD2 est résistante au BI et ne présente aucun symptôme, tandis que Flh41, Flh53 et SC ont une chair translucide plus ou moins brune, caractéristique des symptômes de BI.

Chaque variété a fait l'objet d'une analyse des efflux d'électrolytes, avec une mise en parallèle des symptômes observés. Deux groupes de variétés ont été distingués : MD2 (groupe I), présente un très faible efflux d'électrolytes, donc des membranes très résistantes au TPR. Le deuxième groupe est constitué des variétés SC, Flh53 et Flh41 présentant différents degrés de perméabilité membranaire. Les résultats obtenus ont permis de corrélérer l'intensité des efflux d'électrolytes à la résistance / sensibilité des variétés au BI. Des études menées sur différentes variétés d'ananas sensibles comme Mauritius (groupe Queen), Kew (groupe Cayenne lisse) présentant des symptômes de BI, ont également révélé une variabilité de la résistance membranaire avec notamment des échantillons prélevés dans des tissus sains et des tissus bruns (Weerahewa et Adikaram. 1995). Ces résultats sont cohérents avec ceux d'autres études qui montrent que la tolérance des plantes au déficit hydrique est clairement corrélée au maintien de la régulation de la perméabilité membranaire aux électrolytes (Vasquez-Tello *et al.*, 1990 ; Zuily *et al.*, 1990). L'évaluation de la stabilité membranaire est d'ailleurs utilisée comme indicateur fiable de la contrainte des plantes au froid (Lee et Zhu. 2010 ; Zhang *et al.*, 2010).

Dans le cas du BI, la mesure des fuites d'électrolytes associée à l'intensité des symptômes du BI après TPR, a permis de classer les variétés en fonction de leur sensibilité au BI, soit de la plus sensible à la plus résistante : Flh53, Flh41, SC, MD2.

Enfin, les variétés MD2 (résistante) et SC (sensible) sont les variétés les plus cultivées et les plus exportées, et de plus elles présentent des symptômes bien marqués en réponse TPR. Ces deux variétés ont donc été choisies comme modèle expérimental pour la suite des travaux.

La perte de perméabilité membranaire démontrée par les mesures d'efflux d'électrolytes pourrait au moins partiellement expliquer les symptômes que présentent les fruits atteints de BI. En effet, la translucidité de la chair, où les sucs vacuolaires envahissent les espaces intercellulaires (Soler 1994a,b), pourrait être en rapport avec des remaniements vacuolaires impliquant la lyse ou la fusion de celles-ci, phénomène qui se produit en réponse aux contraintes abiotiques. Le brunissement des zones atteintes pourraient être du à la mise en contact des phénols vacuolaires, substrats de la PPO chloroplastique et de celle-ci suite à l'action des galactolipases qui hydrolysent le monogalactosyl-diacylglycerol, lipide majeur des thylacoïdes (Matos *et al.*, 2001).

Les endoprotéases et la résistance au BI de l'ananas

Le traitement de post-récolte impliquant un traitement au froid puis un retour à température ordinaire (TPR) induit donc chez les variétés d'ananas sensibles un brunissement interne (BI) qui est dû à une désorganisation des structures cellulaires et des vacuoles. Ce phénomène pourrait être lié à l'action d'hydrolases et en particulier d'acyl-hydrolases dégradant les phospholipides membranaires (El Hafid *et al.*, 1989 ; El Maarouf *et al.*, 1999 ; Matos *et al.*, 2001) et d'endoprotéases attaquant les protéines cytoplasmiques et/ou membranaires (Roy-Macauley *et al.*, 1992, Drame *et al.*, 2007).

Dans cette optique, nous avons analysé le comportement de deux protéases et des gènes qui les codent : une protéase à cystéine CP ou « broméline de fruit » (Fruit bromelain, FB), majoritairement présente dans les fruits et une protéase non encore étudiée chez l'ananas, une protéase à acide aspartique (AP).

Nos résultats montrent une corrélation nette entre la résistance des variétés au BI et l'expression du gène codant la CP (pFB13). La variété résistante MD2 présente une expression du gène pFB13 fortement inhibée par le traitement post-récolte (TPR) tandis que la variété SC est moins affectée. Ces résultats sont en accord avec la réponse à la déshydratation chez le blé puisque l'expression du gène codant la CP est plus faible pour la variété résistante (Simova-Stoilova *et al.*, 2006). En ce qui concerne l'activité enzymatique des CP, elle diminue en réponse au traitement post-récolte TPR, particulièrement chez la variété MD2, ce

qui est cohérent avec l'expression du gène. En conclusion que ce soit pour l'expression du gène codant la broméline de fruit (pFB13) ou pour l'activité enzymatique des CP, traitement post-récolte (TPR) induit une inhibition qui est accentuée chez la variété tolérante MD2.

En ce qui concerne l'inhibiteur naturel de la CP : la cystatine, les résultats indiquent que le TPR induit une sur-expression du gène chez la variété résistante MD2 et une inhibition chez la variété sensible SC. Ainsi nos résultats semblent suggérer une interaction CP/cystatine conférant une résistance de la variété MD2 au froid : l'inhibiteur « bloquant » (blocking inhibitor) le fonctionnement de la cystéine à protéase d'où une réduction de son activité enzymatique. D'ailleurs, d'après la littérature, la cystatine interagit avec la CP lors de contraintes biotiques et abiotiques (Solomon *et al.*, 1999 ; Singh *et al.*, 2011). De plus différents travaux ont montré que l'expression de la cystatine est corrélée à la tolérance des plantes aux contraintes environnementales comme la déshydratation (Diop *et al.*, 2004 ; Huang *et al.*, 2007), excès de sel (Zhang *et al.*, 2008 ; Megdiche *et al.*, 2009) et le froid (Van der Vyver *et al.*, 2003 ; Zhang *et al.*, 2008). Ainsi dans ces conditions l'hypothèse d'une régulation de l'endoprotéase à cystatine par son inhibiteur peut-elle être émise, la cystatine limitant l'effet délétère dû à la désorganisation des structures cellulaires.

Enfin, un ADNc complet codant une endoprotéase à acide aspartique a été isolé pour la première fois chez l'ananas. Le gène a fait l'objet d'une étude structurale, son expression a été étudiée de même que l'activité de l'enzyme dans le cadre de la réponse au TPR. D'après les résultats, l'expression du gène est stimulée et l'activité enzymatique est augmentée par rapport aux témoins chez la variété résistante MD2 en réponse au TPR. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans le cas de Fabacées soumises ou non à la sécheresse laquelle induit une sur-expression du gène qui est régulée chez les variétés résistantes et non chez les variétés sensibles (Cruz de Carvalho *et al.*, 2001 ; Contour-Ansel *et al.*, 2010). Les protéases à acide aspartiques participent à la maturation des protéines, et à l'hydrolyse des protéines dont le turnover est requis afin de synthétiser de nouvelles protéines qui participent à l'adaptation des plantes à leur environnement (Simoes et Faro, 2004).

D'après les résultats obtenus dans le cas de la variété MD2, la cystatine participe à l'inhibition de l'activité protéolytique de la broméline de fruit (CP), ce qui pourrait être relié au maintien de l'intégrité cellulaire détectée lors du test d'efflux d'électrolytes. De plus l'augmentation de l'expression du gène codant la protéase à acide aspartique et la stimulation concomitante de l'enzyme correspondante pourraient être à l'origine de l'activation par

protéolyse d'enzymes nécessaires à l'adaptation de la plante au traitement au froid de post-récolte.

Système anti-radicalaire, espèces activées de l'oxygène et dégradation des membranes

La production des espèces activées de l'oxygène EAO comme le superoxyde (O_2^-), le radical hydroxyle ($\cdot OH$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'oxygène singulet (1O_2) est régulée par le système de détoxification des cellules, constitué de molécules antioxydantes (acide ascorbique, glutathion, vitamines A, C, E, pigments) ou d'enzymes anti-radicalaires comme l'ascorbate peroxydase (APX), la superoxyde dismutase (SOD), la guaiacol peroxydase (POD), la catalase (CAT) (Latowski *et al.*, 2010). Les EAO sont produites lors de la vie de la plante, elles peuvent jouer le rôle de messenger secondaire (Mittler, 2002 ; Neill *et al.*, 2002), mais s'avèrent également toxiques pour les macromolécules (protéines, ADN, lipides) lorsque leur synthèse est stimulée par des contraintes biotiques et abiotiques (Ferrari-Iliou *et al.*, 1994 ; Gill et Tuteja, 2010 ; Martinez et Araya, 2010).

Ainsi les plantes ont mis en place un système antioxydant, afin de limiter les quantités EAO produites en réponse au froid, permettant de rééquilibrer les cellules des tissus (Lee et Lee, 2000). Dans certains cas ces antioxydants permettent une tolérance ou une diminution des symptômes liés à l'exposition des plantes aux contraintes environnementales (Mittler, 2002).

Dans le cas du BI de l'ananas nos travaux menés sur la guaiacol peroxydase, enzyme anti-radicalaire, ont montré que l'activité enzymatique diminue lorsque les fruits des variétés MD2, Flh41, SC, Flh53 sont soumis au froid en post-récolte (TPR). L'activité enzymatique de la POD ne présente pas de lien évident avec la sensibilité ou la résistance des variétés au BI.

Une étude a été initiée avec l'ascorbate peroxydase APX, enzyme anti-radicalaire du cycle de l'ascorbate-glutathion qui est un régulateur majeur du peroxyde d'hydrogène (Martinez et Araya, 2010). Un phénomène de reprise est observable lorsque les fruits sont soumis au traitement post-récolte où l'activité de l'APX est similaire à celle des ananas fraîchement cueillis, suggérant que ce traitement ralentit efficacement la sénescence des fruits. Pourtant l'activité enzymatique de l'APX est fortement activée lorsque les fruits de la variété sensible SC, sont soumis au froid en continu. Ce phénomène est un indicateur de perturbation du métabolisme cellulaire des ananas en réponse au froid.

De plus la variété SC présente suite au traitement au froid en post-récolte, un efflux d'électrolytes important et un brunissement intense de la chair des fruits.

Enfin une inhibition de l'accumulation de transcrit a pu être observée dans les variétés MD2 et SC soumises au froid en post-récolte.

Ces résultats suggèrent une augmentation des EAO dans les tissus soumis au froid (10 jours à 9°C), et une incapacité du système antiradicalaire à protéger les structures cellulaires de la variété SC. Des résultats similaires ont été obtenus dans une étude sur des cultivars de riz différant dans leur sensibilité et tolérance au froid, où une augmentation d'efflux d'électrolytes, une diminution des enzymes anti-radicalaires et une augmentation de MDA reflétant la peroxydation des lipides ont été rapportées dans le cultivar sensible (Huang et Guo, 2005). Nos résultats pourraient suggérer une augmentation des EAO en réponse au froid chez les végétaux (Sevillano *et al.*, 2009), une peroxydation des lipides accrue (Campos *et al.*, 2003), une faible efficacité du système antioxydatif (Imahori *et al.*, 2008) contribuant à la perte d'intégrité des membranes et à l'apparition des dommages au froid (chilling injury).

Conclusion et perspectives

Les travaux présentés dans ce manuscrit sur la réponse des ananas à la contrainte au froid en post-récolte nous amène à proposer un modèle (Figure 1). Les premières étapes de la réponse à la contrainte comme la réception des signaux par les cellules via des senseurs jusqu'à la régulation l'expression des gènes par des facteurs de transcriptions ont fait l'objet de multiples études (Figure 1 ; carrés bleus), mais ne sont jusqu'à présent pas connus dans le cas du froid en post-récolte (TPR). Néanmoins, en réponse au TPR l'expression de certains gènes et les activités enzymatiques correspondantes sont modifiées (Figure 1).

Les résultats obtenus ont confirmé que l'activité de la phénylalanine ammonia-lyase (PAL), enzyme constituant le point de départ du métabolisme des phénylpropanoïdes générant les phénols est fortement stimulée en réponse au TPR chez les variétés sensibles au BI. Les composés phénoliques synthétisés au niveau de différents compartiments comme les plastides sont transférés majoritairement dans la vacuole.

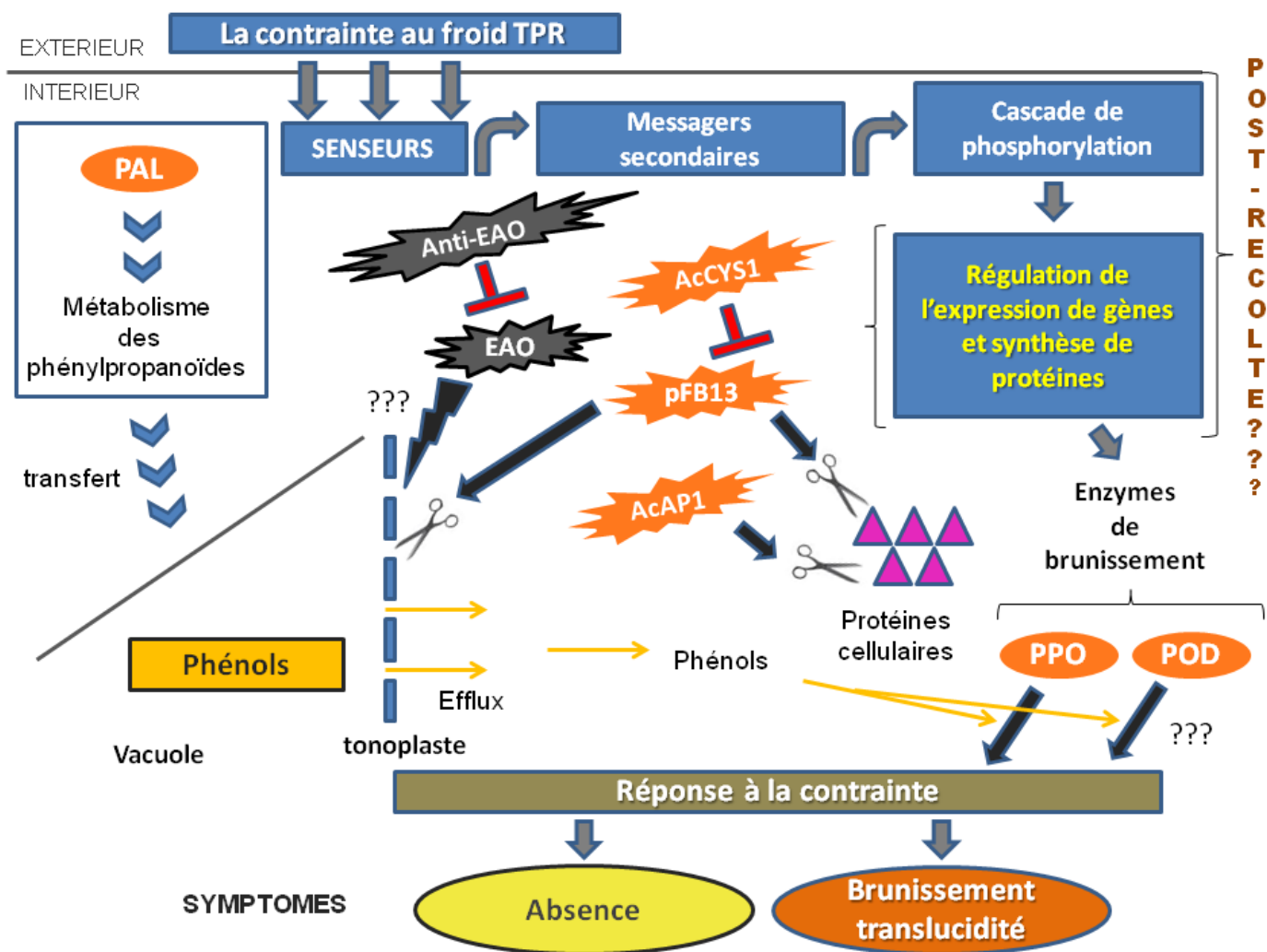


Figure 1 : Modèle proposé pour la réponse des ananas à la contrainte au froid en post-récolte

TPR : traitement post-récolte de 10 jours à 9°C, puis 10 jours à 25°C ; PPO : Polyphénol oxydase ; POD : Guaiacol peroxydase ; PAL : Phénylalanine ammonia-lyase ; EAO : Espèces Actives d'Oxygènes ; Anti-EAO : molécules et enzymes antioxydantes ; pFB13 : broméline de fruit, protéase à cystéine ; AcCYS1 : cystatine ; AcAP1 : protéase à acide aspartique.

Les travaux ont mis en lumière une perte de compartimentation cellulaire chez les variétés sensibles au BI, permettant la mise en contact d'une part des enzymes de brunissement comme la polyphénol oxydase (PPO) dont l'activité est fortement stimulée chez les variétés sensibles au BI et d'autre part de leur substrat phénolique d'origine vacuolaire (Tableau 1 ; Figure 1).

De plus, la mise au point d'outils moléculaire dans le cadre de notre étude comme la sélection de l'actine comme gène de référence pour la qPCR a permis d'étudier les gènes codant les enzymes responsable du catabolisme protéique comme CP (broméline de fruit), cystatine et AP (protéase à acide aspartique). L'étude a révélé qu'après le traitement post-récolte, une expression efficace du gène codant la cystatine, inhibiteur naturel de la broméline de fruit pourrait être à l'origine d'une régulation de l'activité de la protéase à cystéine CP dans la chair des ananas, phénomène qui pourrait participer au maintien de l'intégrité des membranes observé chez la variété résistante (Figure 1). Celle-ci constitue un facteur important dans la résistance/sensibilité des fruits au brunissement interne de l'ananas (Tableau 1 ; Figure 1). De plus la caractérisation d'un nouveau gène codant une protéase à acide aspartique AcAP1 a révélé son implication dans la résistance des ananas au BI (Tableau 1 ; Figure 1). L'étude plus approfondie de la fonction de ce gène dans la réponse au BI devra impliquer la production de la protéine dans un système hétérologue pour son étude biochimique et pour la production d'anticorps utiles à la localisation cellulaire de l'enzyme et pour la caractérisation de processus post-transcriptionnels éventuellement préalables à l'activité de l'enzyme.

Les travaux initiés sur les EAO/antiEAO et leurs influences sur la stabilité des membranes (Figure 1 ; bleu) dans le contexte du BI pourront être poursuivis en dosant les activités enzymatiques et l'expression des gènes codant la SOD et la CAT. Nous pourrions également mesurer la capacité totale du pouvoir oxydant au sein des tissus en dosant le TCA (Pennycooke *et al.*, 2005). De nouvelles séquences partielles de gènes codant pour la PAL, la GST, la CAT, qui ont été clonées au cours du travail de thèse pourraient permettre d'analyser finement le comportement des gènes correspondant.

Nous pourrions estimer également l'effet des EAO (Figure 1 ; gris), sur les membranes via la peroxydation des lipides par la mesure du contenu en Malonyldialdéhyde (MDA). En effet c'est un index de dommages causés par un stress oxydatif couramment utilisé lors de traitement au froid et permettant d'estimer la sévérité des dommages aux membranes (Gulen *et al.*, 2008).

Enfin ce travail ouvre de nouvelles perspectives pour la sélection de variétés d'hybrides d'ananas tolérante au BI en fournissant des outils moléculaires et biochimiques permettant d'évaluer la potentialité des variétés face aux contraintes de froid et de transposer celles-ci sur les plants d'ananas au stade de jeunes plantules. Nos travaux pourront être également utilisés dans une stratégie visant à créer des variétés où les gènes codant CP, AP, et cystatine ou la PAL pourraient être moins exprimée ou réprimée.

D'ailleurs, concernant l'amélioration variétale, les résultats de cette étude montrent que certains « marqueurs physiologiques » permettent de discriminer efficacement la variété résistante au BI (MD2) de la variété sensible (Smooth Cayenne, SC). Ces paramètres sont rassemblés dans le tableau 1, il s'agit des paramètres suivants :

- 1- les efflux d'électrolytes à partir de cubes d'ananas effectués pendant 135 minutes dans un milieu « saccharose » ajusté au Brix du fruit,
- 2- l'expression mesurée par PCR en temps réel des gènes codant la broméline de fruit, la cystatine et la protéase à acide aspartique,
- 3- l'activité enzymatique de la polyphenol oxydase (PPO).

Ainsi ces « marqueurs physiologiques » pourraient-ils être proposés pour cribler les variétés pour leur résistance au BI dans les programmes d'amélioration de l'ananas. Cette stratégie pourrait être utilisée dans le cas d'autres programmes d'amélioration dans la mesure où ces marqueurs correspondent à des processus cellulaires fondamentaux.

En effet, ils ont déjà été utilisés avec succès dans le criblage de variétés de Fabacées (genres *Arachis*, *Phaseolus* et *Vigna*) pour la tolérance à la sécheresse (Vasquez-Tello *et al.*, 1990 ; Cruz de Carvalho *et al.*, 2001 ; Diop *et al.*, 2004 ; Drame *et al.*, 2007). D'autres marqueurs physiologiques tels que l'activité galactolipasique (Matos *et al.*, 2001) et celle de la phospholipase D (El Maarouf *et al.*, 1999) sont également très efficaces, par ailleurs.

Ainsi les « marqueurs physiologiques » conférant une « résistance » ou une « tolérance » pourraient-ils être introduits dans les programmes d'amélioration pour orienter les croisements. Ensuite le devenir de ces « caractères de résistance » pourrait être suivi par PCR dans les variétés nouvelles dans le but de sélectionner les plus performantes.

Tableau 1 : Portrait des variétés MD2 et SC

		Variété Résistante MD2		Variété Sensible SC	
Expression de gènes	Broméline de Fruit (pFB13)	— — — — —		— —	
	Cystatine (AcCYS1)	+++		—	
	Protéase à acide aspartique (AcAP1)	+++		—	
	Traitements	T₀	TPR	T₀	TPR
Activités enzymatiques	Polyphenol oxidase (PPO)	+	++	+	++++ +
	Guaiacol peroxidase (POD)	+++	+	++	+
	Ascorbate peroxidase (APX)	+++	+++	++	++
	Phenylalanine ammonia-lyase (PAL)	+	+	++	++
	Broméline de Fruit	+++	+	++	+
	Protéase à acide aspartique	+	+++	+++	++
Dommages membranaires	Efflux d'électrolytes	+	+	+	+++

Références

Agrisol (1992) Ananas Guide Technique. 15p.

Angiosperm Phylogeny Group III (2009) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. Bot. J. Linn. Soc. 161: 105-121.

Araujo WL, Tohge T, Ishizaki K, Leaver CJ, Fernie AR (2011) Protein degradation- an alternative respiratory substrate for stressed plants. Trends in Plants Sci. 16(9): 489-498.

Baek KH, Choi D (2008) Roles of plant proteases in pathogen defense. Plant Pathol. J. 24 (4): 367-487.

Barrett AJ (1994) Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases. Methods Enzymol. 244: 1- 15.

Barrett AJ, Mc Donald K (1986) Nomenclature: protease, proteinase and peptidase. Biochem. J. 237(3): 935.

Bartholomew DP, Malézieux E (1994) Pineapple. In: Environmental physiology of fruit crops: sub-tropical and tropical crops. Schaeffer B, Anderson P (Eds). CRC Press. 2: 243-291.

Bartholomew DP, Malezieux E, Sanewski GM, Sinclair E (2003a) Inflorescence, and fruit development and yield. In: Bartholomew DP, Paull R, Rohrbach KG (Eds) The pineapple: botany, production and uses. CABI Publishing, Wallingford, UK. 167-202 p.

Bartholomew DP, Paull RE, Rohrbach KG (2003b) The pineapple : botany, production and uses. Bartholomew DP, Rohrbach KG (Eds). CABI Publishing, Wallingfords, UK. 1-301 p.

Bartholomew DP (2009) MD-2' Pineapple Transforms the World's Pineapple Fresh Fruit Export Industry. Issue No. 16. Newsletter Pineapple Working Group of the I.S.H.S.

Beers E, Woffenden BJ, Zhao C (2000) Plant proteolytic enzymes: possible roles during programmed cell death. Plant Mol. Biol. 44 : 399-415.

Beers EP, Jones AL, Dickermann AW (2004) The S8 serine, C1A cysteine and A1 aspartic protease families in Arabidopsis. Phytochem. 65: 43-58.

Belenghi B, Acconcia F, Trovato M, Perazzolli M, Bocedi A, Polticelli F, Ascenzi P, Delledonne M (2003) AtCYS1, a cystatin from Arabidopsis thaliana, suppresses hypersensitive cell death. Eur. J. Biochem. 270: 2593-2604.

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2002) Catalytic strategies . In: Biochemistry. 5th edition. W H Freeman (Ed), New York, USA, 300 p.

Bertoni MS (1919) Contributions à l'étude botanique des plantes cultivées. I : essai d'une monographie du genre Ananas. Ann. Cient. Paraguay . 4: 250-322.

Benchabane M, Schlüter U, Vorster J, Goulet MC, Michaud D (2010) Plant cystatins. Biochimie. 92: 1657-1666.

- Bhattacharyya B (2008)** Bromelain: an overview. *Nat. Prod. Radiance*. 7(4): 359-363.
- Botella MA, Xu Y, Prabha TN, Zhao Y, Narasimhan ML, Wilson KA, Nielsen SS, Bressan RA, Hasegawa PM (1996)** Differential expression of soybean cysteine proteinase inhibitor genes during development and in response to wounding and methyl jasmonate. *Plant Physiol.* 112: 1201-1210.
- Bradford MM (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brat P, Hoang LNT, Soler A, Reynes M, Brillouet JM (2004)** Physicochemical characterization of a New pineapple hybrid (Flhoran 41). *J. Agr. Food Chem.* 52: 6170-6177.
- Brunet J, Varrault G, Zuily-Fodil Y, Repellin A (2009)** Accumulation of lead in the roots of grass pea (*Lathyrus sativus* L.) plants triggers systemic variation in gene expression in the shoots. *Chemosphere*. 77: 113-1120.
- Buchanan-Wollaston V (1997)** The molecular biology of leaf senescence. *J. Exp. Bot.* 48: 181-199.
- Bush DS (1995)** Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46: 95-122.
- Campos PS, Quartin V, Ramalho JC, Nunes MA (2003)** Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea* sp. *Plants. J. Plant Physiol.* 160: 283-292.
- Campos R, Nonogaki H, Suslow T, Saltveit ME (2004)** Isolation and characterization of a wound inducible phenylalanine ammonia-lyase gene (LsPAL1) from Romaine lettuce leaves. *Physiol. Plantarum*. 121: 429-438.
- Cara B, Giovannoni JJ (2008)** Molecular biology of ethylene during tomato fruit development and maturation. *Plant Sci.* 175: 106-113.
- Chen GH, Huang LT, Yap MN, Lee RH, Huang YJ, Cheng MC, Chen SCG (2002)** Molecular Characterization of a Senescence-Associated Gene Encoding Cysteine Proteinase and its Gene Expression during Leaf Senescence in Sweet Potato. *Plant Cell. Physiol.* 43(9): 984-991.
- Chen JY, He LH, Jiang YM, Wang Y, Joyce DC, Ji ZL (2008)** Role of phenylalanine ammonia-lyase in heat pretreatment-induced chilling tolerance in banana fruit. *Physiol Plantarum*. 132: 318-328.
- Chen JH, Su CT, Lin CH, Huang GJ, Lin YH (2010)** Expression of sweet potato cysteine protease SPCP2 altered developmental characteristics and stress responses in transgenic *Arabidopsis* plants. *J. Plant Physiol.* 167: 838-847.
- Chen J, Ouyang Y, Wang L, Xie W, Zhang Q (2009)** Aspartic proteases gene family in rice : gene structure and expression, predicted protein features and phylogenetic relation. *Gene*. 442(1-2): 108-118.

- Chidtragool S, Ketsa S, Bowen J, Ferguson IB, Van Doorn WG (2011)** Chilling injury in mango fruit peel: cultivar differences are related to the activity of phenylalanine ammonia-lyase. *Postharvest Biol. Technol.* 62: 59-63.
- Chinnusamy V, Zhu J, Zhu JK (2007)** Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends Plant Sci.* 12: 444-451.
- Chobotova K, Vernallis AB, Majid FAA (2010)** Bromelain's activity and potential as an anti-cancer agent: Current evidence and perspectives. *Cancer Lett.* 290: 148-156.
- COLEACP-UGPIP (2009a)** Itinéraire technique Ananas MD2 *Ananas comosus*. 58 p.
- COLEACP-UGPIP (2009b)** Itinéraire technique Ananas cayenne *Ananas comosus*. 62 p.
- Conn S, Gilliam M (2010)** Comparative physiology of elemental distributions in plants. *Ann Bot.* 105: 1081-1102.
- Contour-Ansel D, Torres-Franklin ML, Zuily-Fodil Y, Cruz de Carvalho MH (2010)** An aspartic acid protease from common bean is expressed 'on call' during water stress and early recovery. *J. Plant Physiol.* 167(18): 1606-1612.
- Corbineau F, Engelmann F, Côme D (1990)**. Ethylene production as an indicator of chilling injury in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryos. *Plant Sci.* 71: 29-34.
- Cruz de Carvalho MH, D'Arcy-Lameta A, Roy-Macauley H, Gareil M, El Maarouf H, Pham-Thi AT, Zuily-Fodil Y (2001)** Aspartic protease in leaves of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.): enzymatic activity, gene expression and relation to drought susceptibility, *FEBS Lett.* 492: 242-246.
- Cruz de Carvalho MH (2008)** Drought stress and reactive oxygen species: production, scavenging and signaling. *Plant Signal. Behav.* 3: 156-165.
- Cruz de Carvalho MH, Pham-Thi AT, Gareil M, Arcy-Lameta A, Zuily-Fodil Y (2004)** Isolation and characterization of an aspartic proteinase gene from cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *J. Plant Physiol.* 161: 971-976.
- Cunha GAP (2005)** Applied aspects of pineapple flowering. *Bragantia, Campinas.* 64(4): 499-516.
- Davies DR (1990)** The structure and function of the aspartic proteinases. *Ann. Rev. Biophys. Chem.* 19: 189-215.
- De Paolis A, Pignone D, Morgese A, Sonnante G (2008)** Characterization and differential expression analysis of artichoke phenylalanine ammonia-lyase-coding sequences. *Physiol. Plantarum.* 132: 33-43.
- D'hondt k, Bosch D, Van Damme J, Goethals M, Vanderkerckhove J Krebbers E (1993)** An aspartic proteinase present in seeds cleaves Arabidopsis 2 S albumin precursors *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 268: 20884-20891.

- D'hondt K, Stack S, Gutteridge S, Vandekerckhove J, Krebbers E, Gal S (1997)** Aspartic proteinase genes in the *Brassicaceae Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus*. *Plant Mol Biol* 33: 187–192.
- Ding JP, Pickard BG (1993)** Modulation of mechanosensitive calcium-selective cation channels by temperature. *Plant. J.* 3: 713-720.
- Diop NN, Kidrič M, Repellin A, Gareil M, d'Arcy-Lameta A, Pham Thi AT, Zuily-Fodil Y (2004)** A multicystatin is induced by drought-stress in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) leaves. *FEBS Lett.* 577: 545-550.
- Dixon RA, Paiva NL (1995)** Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *Plant Cell.* 7(7): 1085-1097.
- Dodd AN, Kudla J, Sanders D (2010)** The language of calcium signaling. *Ann. Rev. Plant Biol.* 61: 593-620.
- Dong CH, Hu X; Tang W; Zheng X, Xianwu Z, Kim Y S, Lee BH, Zhu JK (2006)** A putative Arabidopsis nucleoporin, AtNUP160, is critical for RNA export and required for plant tolerance to cold stress. *Mol. Cell Biol.* 26 (24): 9533-9543.
- Dramé NK, Clavel D, Repellin A, Passaquet C, Zuily Fodil Y (2007)** Water deficit induces variation in expression of stress-responsive genes in two peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars with different tolerance to drought. *Plant Physiol. Biochem.* 45 (3-4): 236-243.
- Drøbak BK, Franklin-Tong VE, Staiger CJ (2004)** Tansley review: the role of the actin cytoskeleton in plant cell signaling. *New Phytol.* 163 : 13-30.
- El-Hafid L, Pham Thi AT, Zuily-Fodil Y, Vieira da Silva JB (1989)** Enzymatic breakdown of polar lipids in cotton leaves under water stress. Degradation of monogalactosyldiacylglycérol. *Plant Physiol. Biochem.* 27: 495-502.
- El Maarouf H, Zuily-Fodil Y, Gareil M, D'arcy-Lameta A, Pham Thi AT (1999)** Enzymatic activity and gene expression under water stress of phospholipase D in two cultivars of *Vigna unguiculata* L. Walp differing in their drought tolerance. *Plant Mol Biol.* 39: 1257-1265.
- Esteban-García B, Garrido-Cárdenas JA, Alonso DL, García-Maroto F (2010)** A distinct subfamily of papain-like cystein proteinases regulated by senescence and stresses in *Glycine max*. *J. Plant Physiol.* 167: 1101-1108.
- FAO, Codex alimentarius (2007)** Fruits et légumes frais, 1^é édition, Rome. 41 p.
- FAO (decembre 2009)** Joint meeting of the fourth session of the sub-group on bananas and the fifth session of the sub-group on tropical fruits. Tropical fruit compendium. Rome 9-11 december 2009. 32 p.
- Faro C, Gal S (2005)** Aspartic proteinase content of the Arabidopsis genome. *Curr Protein Pept Sci.* 6: 493-500.

- Faro C, Ramalho-Santos M, Vieira M, Mendes A, Simoes I, Andrade R, Verissimo P, Lin XL, Tang J, Pires E (1999)** Cloning and characterization of cDNA encoding cardosin A, an RGD-containing plant aspartic proteinase. *J. Biol. Chem.* 274: 28724–28729.
- Ferrari-Iliou R, D’Arcy-Lameta A, Pham Thi AT, Zuily-Fodil Y, Mazliak P (1994)** Effect of drought on phytodynamic peroxidation of leaf total lipophilic extracts. *Phytochem.* 37: 1237-1243.
- Forsthoeft NR, Cushman MA, Ostrem JA, Cushman JC (1998)** Induction of a cysteine protease cDNA from *Mesembryanthemum crystallinum* leaves by environmental stress and plant growth regulators. *Plant Sci.* 136: 195-203.
- Foyer CH, Halliwell B (1976)** The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta.* 133: 21-25.
- Foyer CH, Noctor G (1998)** Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 49: 249-279.
- Foyer CH, Noctor G (2005)** Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell.* 17: 1866-1875.
- Foyer CH, Noctor G (2009)** Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxid. Redox Sign.* 11: 861-905.
- Foyer CH, Noctor G (2011)** Ascorbate and Glutathione: The Heart of the Redox Hub. *Plant Physiol.* 155: 2-18.
- FruiTrop (2008)** Dossier du mois: l’ananas. Fruitrop Close-up report, Cirad-flhor, Observatoire des marches. *FruiTrop.* 154: 6-30.
- Fung RWM, Wang CY, Smith DL, Cross KC, Tian M (2004)** MeSA and MeJA increase steady-state transcript levels of alternative oxidase and resistance against chilling injury in sweet peppers (*capsicum annuum* L.). *Plant Sci.* 166: 711-719.
- Garcia-Lorenzo M, Sjodin A, Jansson S, Funk C (2006)** Protease gene families in *Populus* and *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol.* 6: 30.
- Gemel J, Kaniuga Z (1987)** Comparison of galactolipase activity and free fatty acid levels in chloroplasts of chill-sensitive and chill-resistant plants. *Eur. J. Biochem.* 166: 229-233.
- Gill SS, Tuteja N (2010)** Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 48: 909-930.
- Gong Z, Lee H, Xiong L, Jagendorf A, Stevenson B, Zhu JK (2002)** RNA helicase-like protein as an early regulator of transcription factors for plant chilling and freezing tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 11507-11512.
- Graham M, Ko L, Hardy V, Robinson S, Sawyer B, O’Hare T, Jobin M, Dahler J, Underhill S, Smith M (2000)** The development of blackheart resistant pineapples through genetic engineering. *Acta Hort. ISHS.* 529 : 133-138.

- Grudkowska M, Zagdanska B (2004)** Multifunctional role of plant cysteine proteinases. *Acta Biochim. Pol.* 51(3): 609-624.
- Guevara MG, Daelo GR, Oliva CR (2001)** Purification and characterization of an aspartic protease from potato leaves. *Physiol. Plantarum* .112: 321-326.
- Guevara MG, Oliva CR, Huarte M, Daleo GR (2002)** An aspartic protease with antimicrobial activity is induced after infection and wounding in intercellular fluids of potato tubers. *Eur. J. Plant Pathol.* 108: 131–137.
- Guilloteau M, Laloi M, Michaux S, Bucheli P, McCarthy J (2005)** Identification and characterization of the major aspartic proteinase activity in *Theobroma cacao* seeds. *J. Sci. Food Agric.* 85: 549-562.
- Gülen H, Çetinkaya C, Kadioğlu M, Kesici M, Cansev A, Eriş A (2008)** Peroxidase Activity and Lipid Peroxidation in Strawberry (*Fragaria X ananassa*) Plants Under Low Temperature. *J. Biol. Environ. Sci.* 2(6): 95-100.
- Habib H, Khalid MF (2007)** Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. *Biotech. Mol Biol Rev.* 2(3): 068-085.
- Heidarvand L, Maali Amiri R (2010)** What happens in plant molecular responses to cold stress? *Acta Physiol. Plantarum.* 32: 419-431.
- Hewajulige IGN, Wilson Wijeratnam RS, Wijesundera RLC, Abeysekere M, (2003)** Fruit calcium concentration and chilling injury during low temperature storage of pineapple. *J. Sci Food Agri.* 83: 1451-1454.
- Hewajulige IGN, Wilson Wijeratnam S, Wijesundera RLC (2006)** Pre-harvest application of calcium to control black heart disorder in Mauritius pineapples during low-temperature storage. *J. Sci Food Agri* .86: 420-424.
- Hsieh TH, Lee JT, Yang PT, Chiu LH, Charng YY, Wang YC Chan MT (2002)** Heterology expression of the Arabidopsis Crepeat/ Dehydration Response Element Binding Factor1 gene confers elevated tolerance to chilling and oxidative stresses in transgenic tomato. *Plant Physiol.* 129: 1086-1094.
- Holdaway-Clarke TL, Walker NA, Hepler PK, Overall RL (2000)** Physiological elevations in cytoplasmic free calcium by cold or ion injection result in transient closure of higher plant plasmodesmata. *Planta.* 210: 329-335.
- Horry JP (2007)** News from France. CIRAD Pineapple genebank database online. Pineapple News. (14): 16. <http://collections.antilles.inra.fr/BRCPortal/initHome.do>.
- Huang Y, Xiao B, Xiong L (2007)** Characterization of a stress responsive proteinase inhibitor gene with positive effect in improving drought resistance in rice. *Planta.* 226: 73-85.
- Huang M et Guo Z (2005)** Responses of antioxidative system to chilling stress in two rice cultivars differing in sensitivity. *Biol. Plantarum.* 49(1): 81-84.
- Hu H, Li X, Dong C, Chen W (2011)** Effects of wax treatment on quality and postharvest physiology of pineapple fruit in cold storage. *Afr. J. Biotechnol.* 10(39): 7592-7603.

- Hwang JE, Hong JK, Je JH, Lee KO, Kim DY, Lee SY, Lim CO (2009)** Regulation of seed germination and seedling growth by an Arabidopsis phytocystatin isoform, AtCYS6. *Plant Cell Rep.* 28 : 1623-1632.
- Hwang JE, Hong JK, Lim CJ, Chen H, Je J, Yang KA, Kim DY, Choi YJ, Lee SY, Lim CO (2010)** Distinct expression patterns of two Arabidopsis phytocystatin genes At CYS1 and At CYS2 during development and abiotic stresses. *Plant Cell Rep.* 29(8): 905-915.
- IRFA (1984)** La culture de l'ananas d'exportation en Côte d'Ivoire. Manuel du planteur. Les nouvelles Editions Africaines, Abidjan. 117 p.
- Imahori Y, Takemura M, Bai J (2008)** Chilling-induced oxidative stress and antioxidant responses in mume (*Prunus mume*) fruit during low temperature storage. *Postharvest Biol. Technol.* 49: 54-60.
- Janowiak F, Maas B, Dorffling (2002)** Importance of abscisic acid for chilling tolerance of maize seedlings. *J. Plant Physiol.* 159: 635-643.
- Jian LC, Li JH, Chen WP, Li PH, Ahlstrand GG (1999)** Cytochemical Localization of Calcium and Ca²⁺-ATPase Activity in Plant Cells under Chilling Stress: a Comparative Study between the Chilling-Sensitive Maize and the Chilling-Insensitive Winter Wheat. *Plant Cell. Physiol.* 40(10): 1061-1071.
- Jones DH (1984)** Phenylalanine ammonia-lyase: regulation of its induction and its role in plant development. *Phytochem.* 23(7): 1349-1359.
- Joomwong A, Sornsrivichai J (2006)** Impact of cropping season in Northern Thailand on the Quality of Smooth Cayenne pineapple I. Influence on morphological attributes. *Int. J. Agric. Biol.* 7(3): 482-490.
- Jung DY, Lee O, Kim YJ, Lee JH, Pulla R, Sathiyaraj G, Shim JS, Yang DC (2010)** Molecular characterization of a cysteine proteinase inhibitor, PgCPI, from *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Acta Physiol. Plantarum.* 32: 961-970.
- Kaewapichai W, Kaewtrakulpong P, Prateepasen A, Khongkraphan K (2007)** Fitting a Pineapple Model for Automatic Maturity Grading. *IEEE International Conference.* 1: 257-260.
- Kanuiga Z (2008)** Chilling response of plants: importance of galactolipase, free fatty acids and free radicals. *Plant Biol.* 10: 171-184.
- Khanna-Chopra R, Srivalli B, Ahlawat Y (1999)** Drought induces many forms of cysteine proteases not observed during natural senescence. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 255: 324-327.
- Kim W, Erlandsen H, Surendran S, Stevens RC, Gamez A, Michols-Matalon K, Tyring SK, Matalon R (2004)** Trends in Enzyme Therapy for Phenylketonuria. *Mol Ther.* 10: 220-224.
- Ko HL, Campbell MP, Jobin-Décor MP, Eccleston KL, Graham MW, Smith MK (2006)** The Introduction of Transgenes to Control Blackheart in Pineapple (*Ananas Comosus L.*) cv. Smooth Cayenne by Microprojectile Bombardment. *Euphytica.* 150 : 387-395.

- Kruger J, Thomas CM, Golstein C, Dixon MS, Smoker M, Tang S, Mulder L, Jones JDG (2002)** A Tomato Cysteine Protease Required for Cf-2-Dependent Disease Resistance and Suppression of Autonecrosis. *Science*. 296: 744-747.
- Kulma A, Szopa (2007)** Catecholamines are active compounds in plants. *Plant Sci*. 172: 433-440.
- Lako J, Trenerry VC, Wahlqvist M, Wattanapenpaibon N, Sotheeswaran S, Premier R (2007)** Phytochemical flavonols, carotenoids and the antioxidant properties of a wide selection of Fijian fruit, vegetables and other readily available foods. *Food Chem*. 101: 1727-1741.
- Latowski D, Surówska E, Strzalka K (2010)** Regulatory role of components of ascorbate-glutathione pathway in plant stress tolerance. In: *Ascorbate-glutathione pathway and stress tolerance in plants*, Naser AA, Umar S, Chan MT (Eds), Springer, London, England, 443 p.
- Laville E (1994)** La protection des fruits tropicaux après récolte. CIRAD-COLEACP. Tec & Doc-Lavoisier. 13 p.
- Lawrence PK, Koundal KR (2002)** Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *Electron. J. of Biotechnol*. 5(1): 93-109.
- Leal F, Antoni MG (1981)** Especies del género *Ananas*: origen y distribución geográfica. *Rev. Fac. Agron. Maracay*. 29: 5-12.
- Lebeau F, Imele JP, Teisson C, Delhove G (2009)** Efficacité de la technique d'induction florale d'*Ananas comosus* (L.) Merr. Au moyen de charbon actif enrichi à l'éthylène (TIFBio). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*. 13(3): 395-400.
- Lee DH, Lee CB (2000)** Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays. *Plant Sci*. 159: 75-85.
- Lee BH, Zhu JK (2010)** Phenotypic Analysis of Arabidopsis Mutants: Electrolyte Leakage after Freezing Stress. *Cold. Spring Harb. Protoc*. (1): pdb.prot4970.
- Liu C, Liu Y, Yi G, Li W, Zhang G (2011)** A comparison of aroma components of pineapple fruits ripened in different seasons. *Afr. J. Agric. Res*. 6(7): 1771-1778.
- Lu X, Sun D, Li Y, Shi W, Sun G (2011)** Pre- and post-harvest salicylic acid treatments alleviate internal browning and maintain quality of winter pineapple fruit. *Sc Hortic*. 130: 97-101.
- Lukatkin AS (2005)** Initiation and Development of chilling injury in leaves of chilling-sensitive plants. *Russ. J. Plant Physiol*. 52(4): 542-546.
- Lyons JM (1973)** Chilling injury in plant. *Ann. Rev. Plant Physiol*. 24: 445-456.
- Lyons JM, Asmundsen CM (1965)** Solidification of unsaturated saturated fatty acid mixtures and its relationship to chilling sensitivity in plants. *J. Am. Oil Chemical Soc*. 42: 1056-1058.
- Lyons JM, Wheaton TA, Pratt HK (1964)** Relationship between the physical nature of mitochondrial membranes and chilling sensitivity in plants. *Plant Physiol*. 39 : 262-268.

- Macheix JJ, Fleuriet A, Jay-Allemand C (2005)** Importance de l'oxydation enzymatique des composés phénoliques dans la modification des qualités sensorielles et nutritionnelles des végétaux. In: Les composés phénoliques des Végétaux. Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. (Eds) Presses polytechniques et universitaires romandes. 192 p.
- Maciel F, Salles C; Retamal C, Gomes V, Machado O (2011)** Identification and partial characterization of two cysteine proteases from castor bean leaves (*Ricinus communis* L.) activated by wounding and methyl jasmonate stress. *Acta Physiol. Plantarum*. 33 (5): 1867-1875.
- Makarenko SP, Konstantinov YM, Khotimchenko SV, Konenkina TA, Arziev AS (2003)** Fatty Acid Composition of Mitochondrial Membrane Lipids in Cultivated (*Zea mays*) and Wild (*Elymus sibiricus*) Grasses. *Russ. J. Plant Physiol*. 50: 487-492.
- Mao LC, Wang GZ, Zhu CG, Pang HQ (2007)** Involvement of phospholipase D and lipoxygenase in response to chilling stress in postharvest cucumber fruits. *Plant Sci*. 172: 400-405.
- Marangoni AG, Palma T, Stanley DW (1996)** Membrane effects in postharvest physiology. *Postharvest Biol. Tech*. 7: 193–217.
- Margis R, Reis EM, Villeret V (1998)** Structural and phylogenetic relationships among plant and animal cystatins. *Arch. Biochem. Biophys*. 359(1): 24-30.
- Martinez JP, Araya H (2010)** Ascorbate-Glutathione cycle: enzymatic and non enzymatic integrated mechanisms and its biomolecular regulation. In: Ascorbate-gluthatione pathway and stress tolerance in plants, Naser AA, Umar S, Chan MT (Eds), Springer, London, England, 443 p.
- Martinez M, Cambra I, Carrillo L, Diaz-Mendoza M, Diaz I (2009)** Characterization of the entire cystatin gene family in barley and their target cathepsin L-like cysteine-protease, partners in the hordein mobilization during seed germination. *Plant Physiol*. 151: 1531-1545.
- Maruthasalam S, Shiu LY, Loganathan M, Lien WL, Liu YL, Sun CM, Yu CW, Hung SH, Ko Y, Lin CH (2010)** Forced flowering of pineapple (*Ananas comosus* cv. Tainon 17) in response to cold stress, ethephon and calcium carbide with or without activated charcoal. *Plant Growth Reg*. 60(2): 83-90.
- Matos AR, D'Arcy-Lameta A, França MGC, Zuily-Fodil Y, Pham-Thi AT (2001)** A novel patatin-like gene stimulated by drought stress encodes a galactolipid acyl hydrolase. *FEBS Lett*. 491(3): 188-192.
- Mayer AM (1987)** Polyphenol oxidase and peroxidase in plants recent progress. *Phytochem*. 26: 11-20.
- Megdiche W, Passaquet C, Zourrig W, Zuily-Fodil Y, Abdelly C (2009)** Molecular cloning and characterization of novel cystatin gene in leaves *Cakile maritime* halophyte. *J. Plant Physiol*. 166: 739-749.
- Miller EV (1951)** Physiological studies of the pineapple, *Ananas comosus*. L. Merr. With special reference to physiological breakdown. *Plant Physiol*. 26: 66-75.

- Miller GAD, Suzuki N, Ciftci-Yilmaz S, Mittler RON (2010)** Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell. Environ.* 33: 453-467.
- Min XJ, Bartholomew DP (1997)** Temperature affects ethylene metabolism and fruit initiation and size of pineapple. *Acta Hort. ISHS.* 425: 329-338.
- Mittler R (2002)** Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7: 405-410.
- Moyle RL, Crowe ML, Ripi-Koia J, Fairbairn DJ, Botella JR (2005)** PineappleDB: An online pineapple bioinformatics resource. *BMC Plant Biology.* 5: 1-5.
- Mutlu A, Gal S (1999)** Plant aspartic proteinase: enzymes on the way to a function. *Physiol. Plant.* 105: 569-576.
- Muntz K, Shutov AD (2002)** Legumains and their functions in plants. *Trends Plant Sci.* 7: 340-344.
- Murata N, Nishida (1990)** Lipids in relation to chilling sensitivity of plants. In *Chilling Injury of Horticultural Crops*, C.Y. Wang (Ed), Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 181-199.
- Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hurst RD, Hancock JT (2002)** Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *J. Exp. Bot.* 53(372): 1237-1247.
- Neitzel JJ (2010)** Enzyme Catalysis: The Serine Proteases. *Nat. Edu.* 3(9): 21.
- Nuotio S, Heino P, Palva ET (2001)** Signal transduction under low-temperature stress. In *Crop Responses and Adaptations to Temperature Stress*. Basra, AB (Ed). Food Products Press. Binghamton, New York, 151-176 p.
- O'Hare T, Dahler J, Smith L, Wong L (2002)** Paclobutrazol fails to reduce pineapple 'blackheart' expression associated with a putative gibberellin-controlled PPO gene. May 2002. .Issue No. 9. Newsletter Pineapple Working Group of the I.S.H.S. 32 p.
- Okimoto MC (1948)** Anatomy and histology of the pineapple inflorescence and fruits. *Bot Gaz.* 110(2): 217-231.
- Oliveira AS, Xavier-Filho J, Sales MP (2003)** Cysteine proteinases and cystatins. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 46(1): 91-104.
- Örvar BL, Sangwan V, Omann F, Dhindsa RS (2000)** Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *Plant J.* 23: 785-794.
- Otto HH, Schirmeister T (1997)** Cysteine Proteases and their inhibitors. *Chem. Rev.* 97: 133-171.
- Panavas T, Pikula A, Reid PD, Rubinstein B, Walker EL (1999)** Identification of senescence-associated genes from daylily petals. *Plant Mol Biol* 40: 237-248
- Parkin KL, Kuo SJ (1989)** Chilling induced lipid degradation in cucumber (*Cucumis sativa* L. cv hybrid c) fruit. *Plant Physiol.* 90: 1049-1056.

- Paul RE (1994)** Chilling injury of crops of tropical and subtropical origin. In: Chilling injury of horticultural crops. Wang GY (Eds.). Florida: CRC Press. 17-36 p.
- Paul RE, Chen CC (2003)** Postharvest physiology, handling and storage of pineapple. In: Bartholomew, D.P. et al., (Eds). The pineapple: botany, production and uses. CABI Publishing, Wallingford, UK. 253-279 p.
- Paul RE, Rohrbach K G (1985)** Symptom development of chilling injury in pineapple fruit (*Ananas comosus*). J. Am. Soc Hort. Sci. 110: 100-105.
- Pena LB, Tomaro ML, Gallego SM (2006)** Effect of different metals on protease activity in sunflower cotyledons. Elect J. Biotechnol 9(3): 258-262.
- Pennycooke JC, Cox S, Stushnoff C (2005)** Relationship of cold acclimation, total phenolic content and antioxidant capacity with chilling tolerance in petunia (*Petunia x hybrida*). Environ. Exp. Bot. 53: 225-232.
- Pernas M, Sanchez-Monge R, Salcedo G (2000)** Biotic and abiotic stress can induce cystatin expression in chestnut. FEBS Lett. 467: 206–10.
- Perez-Tello GO, Silva-Espinoza BA, Vargas-Arispuro I, Briceno-Torres BO, Martinez-Tellez MA (2001)** Effect of Temperature on Enzymatic and Physiological Factors Related to Chilling Injury in Carambola Fruit (*Averrhoa carambola* L.). Biochem. Biophys. Res. Comm. 287: 846–851.
- Pfaffl MW (2001)** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Oxford Univ. Press Nucleic Acids Research. 29(9): 2002-2007.
- Pham Thi AT, Sidibé-Andrieu MD, Zuily-Fodil Y, Viera da Silva (1989)** Effects of low temperature on lipid and fatty acid composition of sorghum roots and shoots. In: Biological role of plant lipids. Biacs PA, Gruiz K, Kremmer T (Eds). 555-558 p.
- Pickersgill RW, Harris GW, Garman E (1992)** Structure of monoclinic papain at 1.60 Å resolution. Acta Crystallogr. Sect. B. 48: 59–67.
- Pineapple best practice manual (2009).** The pineapple. 1-15 p.
- Pinhero RG, Paliyath G, Yada RY, Murr DP (1998)** Modulation of phospholipase D and lipoxygenase activities during chilling. Relation to chilling tolerance of maize seedlings. Plant Physiol. Biochem. 36: 213-224.
- Poovaiah BW (1988)** Molecular and cellular aspects of calcium action in plants. HortScience. 23(2): 267-271.
- Prasad TK (1996)** Mechanisms of chilling-induced oxidative stress injury and tolerance in developing maize seedlings: changes in antioxidant system, oxidation of proteins and lipids, and protease activities. Plant J. 10: 1017-1026.
- Prasad TK (2001)** Mechanisms of chilling injury. In: Crop responses and adaptations to temperature stress. Basra AS (Eds). Food products press, Binghamton; NY, 302 p.

- Raimbault AK, Marie-Alphonsine PA, Horry JP, Francois-Haugrin M, Romuald K, Soler A (2011)** Polyphenol oxidase and peroxidase expression in four pineapple varieties (*Ananas comosus* L.) after a chilling injury. *J. Agr. Food Chem.* 59(1): 342-348.
- Raison JK (1973)** The influence of temperature-induced phase changes on the kinetics of respiratory and other membrane associated enzyme systems. *Bioenergetics.* 4: 285-309.
- Raison JK, Glenda RO (1990)** Proposals for better understanding of the molecular basis of chilling injury. In: *Chilling injury of horticultural crops*. Wang GY (Eds). Florida: CRC Press. 145-164 p.
- Rawlings ND, Barrett AJ (1994)** Families of cysteine peptidases. *Methods Enzymol.* 244: 461-486.
- Rawlings ND, Barrett AJ (1995)** Families of aspartic peptidases, and those of unknown catalytic mechanism. *Methods Enzymol.* 248: 105-20.
- Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A (2010)** MEROPS: the peptidase database *Nucleic Acids Res.* 38: D227-D233.
- Rebolledo-Martinez L, Uriza DE, Rebolledo-Martinez A, Zagada G (2005)** Slip production of MD-2 hybrid pineapple by three methods: gaullin, leaf pruning and a growth regulator. *Acta Hort.* 666: 277-285.
- Rinaldo D, Mbéguié-A-Mbéguié D, Fils-Lycaon B (2010)** Advances on polyphenols and their metabolism in sub-tropical and tropical fruits. *Trends Food Sci. Tech.* 21: 599-606.
- Rohrbach KG, Leal F, Coppens D'Eeckenbrugge G (2003)** History, distribution and world production. In: *The pineapple : Botany, production and uses*. Bartholomew PE, Paull RE, Rohrbach KG (Eds). Wallingford : CABI Publishing. 1-12 p.
- Rohrbach KG, Paull RE (1982)** Incidence and severity of chilling induced browning of waxed 'Smooth Cayenne' pineapple. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 107:453-457.
- Rooney HCE, Van't Klooster JW, Van der Hoorn RAL, Joosten MHAI, Jones JDG, De Wit PJGM (2005)** Cladosporium Avr2 Inhibits Tomato Rcr3 Protease Required for Cf-2-Dependent Disease Resistance. *Science.* 308(5729): 1783-1786.
- Roy-Macauley H, Zuily-Fodil Y, Kidric M, Pham Thi AT, Viera de Silva J (1992)** Effect of drought stress on proteolytic activities in *Phaseolus* and *Vigna* leaves from sensitive and resistant plants. *Physiol. Plantarum.* 85(1): 90-96.
- Ruelland E, Vaultier MN, Zachowski A, Hurry V (2009)** Cold Signalling and Cold Acclimation in Plants. *Adv. Bot. Res.* 49: 35-150.
- Ruelland E, Zachowski A (2010)** How plants sense temperature. *Environ. Exp. Bot.* 69: 225-232.
- Runeberg-Roos P, Saarma M (1998)** Phytapsin, a barley vacuolar aspartic proteinase, is highly expressed during autolysis of developing tracheary elements and sieve cells. *Plant J.* 15: 139-145.

- Runeberg-Roos P, Tormakangas K, Ostman A (1991)** Primary structure of a barley grain aspartic proteinase resembling mammalian cathepsin D. *Eur. J. Biochem.* 202: 1021-1027.
- Runeberg-Roos P, Kervinen J, Kovaleva V, Raikhel N. V, Gal S (1994)** The Aspartic Proteinase of Barley Is a Vacuolar Enzyme That Processes Probarley Lectin in Vitro. *Plant Physiol.* 105: 321-329.
- Sabehat A, Lurie S, Weiss D (1998)** Expression of small heat-shock proteins at low temperatures: a possible role in protecting against chilling injuries. *Plant Physiol.* 117: 651-658.
- Sahsah Y, Campos P, Gareil M, Zuily-Fodil Y, Pham-Thi AT (1998)** Enzymatic degradation of polar lipids in *Vigna unguiculata* leaves and influence of drought stress. *Physiol. Plantarum.* 104: 577-586.
- Saijo Y, Hata S, Kyozuka J, Shimamoto K, Izui K (2000)** Over-expression of a single Ca²⁺ dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. *Plant J* 23: 319-327.
- Saijo Y, Kinoshita N, Ishiyama K, Hata S, Kyozuka J, Hayakawa T, Nakamura T, Shimamoto K, Yamaya T, Izui K (2001)** A Ca(2+)-dependent protein kinase that endows rice plants with cold and salt-stress tolerance functions in vascular bundles, *Plant Cell Physiol.* 42: 1228–1233.
- Salman A, Goupil P, Filgueiras H, Charles F, Ledoigt G, Sallanon H (2008)** Controlled atmosphere and heat shock affect PAL1 and HSP90 mRNA accumulation in freshcut endive (*Cichorium intybus* L.). *Eur. Food Res. Technol.* 227: 721-726.
- Sanchez-Ballesta MT, Lafuente MT, Zacarias L, Granel A (2000)** Involvement of phenylalanine ammonia-lyase in the response of Fortune mandarin fruits to cold temperature. *Physiol. Plantarum.* 108: 382-389.
- Sano T, Higaki T, Handa K, Kadota Y, Kuchitsu K, Hasezawa S, Hoffmann A, Endter J, Zimmermann U, Hedrich R, Roitsch T (2006)** Calcium ions are involved in the delay of plant cell cycle progression by abiotic stresses. *FEBS Lett.* 580: 597–602.
- Schaller A (2004)** A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta.* 220: 183-197.
- Schaffer M A, Fischer RL (1990)** Transcriptional Activation by Heat and Cold of a Thiol Protease Gene in Tomato. *Plant Physiol.* 93(4): 1486-1491.
- Schaller A, Ryan C (1996)** Molecular cloning of a tomato leaf cDNA encoding an aspartic protease, a systemic wound response protein. *Plant Mol. Biol.* 31: 1073-1077.
- Selvarajah S, Bauchot AD, John P (2001)** Internal browning in cold-stored pineapples is suppressed by a postharvest application of 1-methylcyclopropene. *Postharvest Biol. Technol.* 23: 167-170.
- Selvarajah S, Herath HMW, Bandara DC, Abeysinghe Banda DMG (1998)** Effect of pre-harvest calcium treatment on post-harvest quality of pineapple. *Trop. Agric. Res.* 10: 214-224.

- Selvarajah S, Herath HMW, Bandara DC, Wicramasinghe IP (2000)** Physicological and enzymatic changes during post-harvest low temperature storage periods and the manifestation of symptoms associated with internal Browning in pineapples. *J Food Sci. Technol.* 37(6): 571-576.
- Sevillano L, Sanchez-Ballesta MT, Romojaro F, Flores FB (2009)** Physiological, hormonal and molecular mechanisms regulating chilling injury in horticultural species. Postharvest technologies applied to reduce its impact. *J. Sci. Food Agri.* 89: 555-573.
- Sharom M, Willemot C, Thompson JE (1994)** Chilling injury induces lipid phase changes in membranes of tomato fruit. *Plant Physiol.* 105: 305-308.
- Sheng-hui L, Xiao-ping Z, Guang-ming S (2011)** Changes in endogenous hormone concentrations during inflorescence induction and development in pineapple (*Ananas comosus* cv. Smooth Cayenne) by ethephon. *Afri. J. Biotechnol.* 10(53): 10892-10899.
- Shimada T, Shimada T, Yamada K, Kataoka M, Nakaune S, Koumoto Y, Kuroyanagi M, Tabata S, Kato T, Shinozaki K, Seki M, Kobayashi M, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I (2003)** Vacuolar processing enzymes are essential for proper processing of seed storage proteins in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 278: 32292-32299.
- Shindo T, Van der Hoorn, RAL (2008)** Papain-like cysteine proteases: key players at molecular battlefields employed by both plants and their invaders. *Mol. Plant Pathol.* 9 : 119-125.
- Shyu DJ, Chou, WM, Yiu, TJ, Lin, CP, Tzen, JT (2004)** Cloning, functional expression, and characterization of cystatin in sesame seed. *J. Agric. Food Chem.* 52: 1350-1356.
- Simoes I, Faro C (2004)** Structure and function of plant aspartic proteinases. *Eur. J. Biochem.* 271: 2067-2075.
- Simoes I, Faro R.R, Bur D, Faro C (2007)** Characterization of Recombinant CDR1, an *Arabidopsis* Aspartic Proteinase Involved in Disease Resistance. *J. Biol. Chem.* 282: 31358-31365.
- Simova-Stoilova L, Demirevska K, Petrova T, Tsenov N, Feller U (2009)** Antioxidative protection and proteolytic activity in tolerant and sensitive wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties subjected to long term field drought. *Plant Growth Regul.* 58: 107-117.
- Simova-Stoilova L, Vaseva I, Grigorova B, Demirevska K, Feller U (2010)** Proteolytic activity and cysteine protease expression in wheat leaves under severe soil drought and recovery. *Plant Phys. Biochem.* 48(2-3): 200-206.
- Simova-Stoilova L, Vassileva V, Petrova T, Tsenov N, Demirevska K, Feller U (2006)** Proteolytic activity in wheat leaves during drought stress and recovery. *Gen. Appl. Plant physiol. Spec Issue.* 91-100.
- Singh SP, Pal RK (2008)** Controlled atmosphere storage of guava (*Psidium guajava* L.) fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 47: 296-306.

- Singh M, Bhogal D, Goel A, Kumar A (2011)** Cloning, in silico characterization and interaction of cysteine protease and cystatin for establishing their role in early blight disease in tomato. *J. Plant Biochem. Biotechnol.* 20: 110-117.
- Smith LG (1983)** Causes and development of black heart in pineapples. *Trop. Agric. (Trinidad)* 60:31-35.
- Soares AG, Trugo LC, Botrel N, Da Silva Souza LF (2005)** Reduction of internal browning of pineapple fruit (*Ananas comusus* L.) by preharvest soil application of potassium. *Postharvest Biol. Technol.* 35: 201-207.
- Solanke AU, Sharma AK (2008)** Signal transduction during cold stress in plants. *Physiol. Mol. Biol. Plants.* 14(1-2): 69-79.
- Soler A (1992)** Ananas critères de qualités. Quae (Eds). CIRAD-COLEACP. 48p.
- Soler A (1994a)** Abnormal ripening in pineapple : translucence of the flesh. I. Physical and chemical characteristics of waterlogged fruit. *Fruits.* 49(1): 5-15.
- Soler A (1994b)** Yellowing or translucence: ripening deviation in pineapple. II. Enzymatic characterization. *Fruits.* 49(2): 83-91.
- Solomon M, Belenghi B, Delledonne M, Menachem E, Levine A (1999)** The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. *Plant Cell.* 11(3): 431-44.
- Stewart RJ, Sawyer BJB, Bucheli CS, Robinson SP (2001)** Polyphenol oxidase is induced by chilling and wounding in pineapple. *Aust. J. Plant Physiol.* 28: 181-191.
- Stewart RJ, Sawyer BJB, Robinson SP (2002)** Black heart development following chilling in fruit of susceptible and resistant pineapple cultivars. *Aust J. Exp. Agri.* 42: 195-199.
- Stroeher VL, Maclagan JL, Good AG (1997)** Molecular cloning of a Brassica napus cysteine protease gene inducible by drought and low temperature stress. *Physiol. Plantarum.* 101: 389-397.
- Swete Kelly DE, Bagshaw J (1993)** Effect of fruit handling and fruit coatings on blackheart (internal brown spot) and other aspects of fresh pineapple quality. In: First International Pineapple Symposium, Bartholomew DP, Rohrbach KG (Eds), Acta Hort (ISHS), Honolulu, Hawaii, USA, 334 p.
- Swete Kelly DE, Bartholomew DP (1993)** Pineapple pests and disorders. In: Other Disorders. Broadley, R.H., Wassaman, R.E., Sinclair, E (Eds). QDPI. Brisbane. 61 p.
- Teisson C (1972)** Studies on internal browning of pineapple. *Fruits.* 27(9): 603-612.
- Teisson C, Combres JC (1979)** Le brunissement interne de l'ananas. III. Symptomatologie. *Fruits.* 34(5): 315-329.
- Teisson C, Martin Prevel P, Marchal J (1979a)** Le brunissement interne de l'ananas. IV. Approche biochimique du phénomène. *Fruits.* 34(5): 329-339.

- Teisson C, Lacoëuilhe JJ, Combres JC (1979b)** Le brunissement interne de l'ananas. V. Recherches des moyens de lutte. *Fruits*. 34(6): 399-415.
- Terauchi K, Asakura T, Nishizawa NK, Matsumoto I, Abe K (2004)** Characterization of the genes for two soybean aspartic proteinases and analysis of their different tissue dependent expression. *Planta*. 218: 947-957.
- Thomashow MF (1990)** Molecular genetics of cold acclimation in higher plants. *Adv. Genet.* 28:99-131.
- Thomashow MF (1999)** Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 50: 571-599.
- Timotijevic GS, Milisavljevic MD, Radovic SR, Konstantinovic MM, Maksimovic VR (2010)** Ubiquitous aspartic proteinase as an actor in the stress response in buckwheat. *J Plant Physiol.* 167: 61-68.
- Toivonen PMA, Brummell DA (2008)** Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables. *Postharvest Biol. Technol.* 48: 1-14.
- Turk B, Turk V, Turk D (1997)** Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteases and their protein inhibitors. *Biol Chem.* 378: 141-150.
- Turk V, Stoka V, Turk D (2008)** Cystatins: biochemical and structural properties, and medical relevance. *Front. Biosci.* 1(13): 5406-5420.
- Upchurch R (2008)** Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress. *Biotechnol. Letts.* 30: 967-977.
- Urquiaga I, Leighton F (2000)** Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biol. Res.* 33 (2): 55-64.
- Uriza-Avila D, Rebolledo-Martinez A, Rebolledo-Martinez (2005)** Short cycle crops intercropped with pineapple an option to increase productivity. IV International Pineapple Symposium Foreword and Preface. *Acta. Hort (ISHS)*.
- Van de Poel B, Ceusters J, De Proft MP (2009)** Determination of pineapple (*Ananas comosus*, MD-2 hybrid cultiv ar) plant maturity, the efficiency of flowering induction agents and the use of activated carbon. *Sci Hort.* 120(1): 58-63.
- Van der Hoorn RAL (2008)** Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms. *Ann. Rev. Plant Biol.* 59: 191-223.
- Van der Hoorn RAL, Jones JDG (2004)** The plant proteolytic machinery and its role in defence. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7: 400-407.
- Van der Vyver C, Schneidereit J, Driscoll S, Turner J, Kunert K, Foyer CH (2003)** Oryzacystatin I expression in transformed tobacco produces a conditional growth phenotype and enhances chilling tolerance. *Plant Biotechnol. J.* 1: 101-112.
- Van Lelyveld LJ, De Brun JA (1977)** Polyphenols, ascorbic acid and related enzyme activities associated with blackheart in Cayenne pineapple fruit. *Agrochemophysica* .9: 1-6.

- Van Lelyveld LJ, Visser GJ, Swarts DH (1991)** The effect of various storage temperatures on peroxidase activity and protein PAGE gel electrophoresis in 'Queen' pineapple fruit. *J. Hortic. Sci.* 66(5): 629-634.
- Vasquez-Tello A, Zuily-Fodil Y, Pham Thi AT, Vieira Da Silva JB (1990)** Electrolyte and Pi Leakages and Soluble Sugar Content as Physiological Tests for Screening Resistance to Water Stress in *Phaseolus* and *Vigna* Species. *J. Exp. Bot.* 41(7): 827-832.
- Vierstra RD (1996)** Proteolysis in plants: mechanisms and functions. *Plant molecular biology.* 32: 275-302.
- Wan B, Lin Y, Mou T (2007)** Expression of rice Ca²⁺-dependent protein kinases (CDPKs) genes under different environmental stresses. *FEBS Lett.* 581: 1179-1189.
- Wang W, Vinocur B, Altman A (2003)** Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta.* 218: 1-14.
- Wang J, Li X, Liu Y, Zhao X (2010)** Salt stress induces programmed cell death in *Thellungiella halophila* suspension-cultured cells. *J. Plant Physiol.* 167: 1145-1151.
- Weeda SM, Kumar GNM, Knowles NR (2009)** Developmentally linked changes in proteases and protease inhibitors suggest a role for potato multicystatin in regulating protein content of potato tubers. *Planta.* 230: 73-84.
- Weerahewa D, Adikaram NKB (2005)** Some biochemical factors underlying the differential susceptibility two cultivars to internal browning disorder. *Ceyl. J. Sci.* 34: 7-20.
- Weerahewa D, Adikaram NKB (2010)** Enhanced cold-tolerance in pineapple (*Ananas comosus* 'Mauritius') by combined cold- and heat-shock treatments or intermittent warming. *J. Horti. Sci. Biotechnol.* 86(1): 13-18.
- Wiederanders B (2003)** Structure-function relationships in class CA1 cysteine peptidase propeptides. *Acta Biochim. Pol.* 50(3): 691-713.
- Wijesinghe WAJP, Sarananda KH (2002)** Post-harvest quality of "Mauritus" pineapple and reasons for reduced quality. *Trop. Agri. Res. Extension.* 5(1, 2): 53-56.
- William DDF, Fleisch F (1992)** Historical review of pineapple breeding in Hawaii. *Acta Hort.* 334: 67-76.
- Wilson Wijeratnam RS, Abeyesakere M, Surjani P (1993)** Studies on black heart disorder in pineapple varieties grown in sri lanka. In: First International Pineapple Symposium, Bartholomew D.P, Rohrbach K.G (Eds), Acta Hort (ISHS), Honolulu, Hawaii, USA, 334 p.
- Wilson Wijeratnam RS, Hewajulige IGN, Wijesundera RLC, Abeyesakere M (2006)** Fruit calcium concentration and chilling injury during low temperature storage of pineapple. In: Proceedings of the fifth international pineapple symposium, Joubert PH (Ed), Acta Hort (ISHS), Leiden, Netherlands. 702: 212.
- Wolfe JOE (1978)** Chilling injury in plants, the role of membrane lipid fluidity. *Plant Cell Environ.* 1: 241-247.

- Xia Y, Suzuki H, Borevitz J, Blount J, Guo Z, Patel K, Dixon RA Lamb C (2004)** An extracellular aspartic protease functions in *Arabidopsis* disease resistance signaling. *EMBO J.* 2: 980-988.
- Xiong L, Schumaker KS, Zhu JK (2002)** Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell.* 14: S165–S183.
- Yacob A (2010)** Global overview and trade of the pineapple industry. Abstracts of the 7th International Pineapple Symposium. July 13-15 2010 at Johor Baru, Malaysia. Issue No. 17 Addendum to Newsletter Pineapple Working Group of the I.S.H.S. 37 p.
- Yada RY, Tanaka T (2004)** Structure-function relationships of aspartic proteinases. In: *Soft Materials - Structure and Dynamics*. Dutcher JR, Marangoni AG (Eds). CRC Press, New York, 227-264.
- Yamaguchi S (2008)** Gibberellin metabolism and its regulation. *Ann. Rev. Plant Biol.* 59: 225-251.
- Yoruk R, Marshall MR (2003)** Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review. *J. Food Biochem.* 27: 361-422.
- You-Lin T, Yu-Chan Z, Xing-Jie T (1997)** A study on factors inducing and controlling postharvest blackheart in pineapples. In: *proceedings of the second International Pineapple Symposium*. Martin-Prével P, Hugon R (Eds). *Acta Hort.* (ISHS). 425: 595-603.
- Yuen CMC (1994)** Calcium and fruit storage potential. In: *Postharvest Handling of Tropical Fruits*. Champ BR, Highly, Johnson GI (Eds). *ACIAR Proceedings*. Australia, Canberra. 50 : 218-227.
- Zhang X, Liu S, Takano T (2008)** Two cysteine proteinase inhibitors from *Arabidopsis thaliana*, AtCYSa and AtCYSb, increasing the salt, drought, oxidation and cold tolerance. *Plant Mol. Biol.* 68: 131-143.
- Zhang, C, Ding Z, Xu X, Wang Q, Qin G, Tian S (2010)** Crucial roles of membrane stability and its related proteins in the tolerance of peach fruit to chilling injury. *Amino Acids.* 39: 181-194.
- Zhou Y, Dahler JM, Underhill SJR, Wills RBH (2003a)** Enzymes associated with blackheart development in pineapple fruit. *Food Chem.* 80: 565-572.
- Zhou YC, O'Hare TJ, Jobin-Decor M, Underhill SJR, Wills RBH, Graham MW (2003b)** Transcriptional regulation of a pineapple polyphenol oxidase gene and its relationship to blackheart. *Plant Biotechnol. J.* 1(6): 463-478.
- Zhu J, Dong CH, Zhu, JK (2007)** Interplays between cold responsive gene regulation, metabolism and RNA processing during plant cold acclimation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10: 290-295.
- Zuily-Fodil Y, Vasquez Tello A, Vieira da Silva J (1990)** Effect of water deficit on cell permeability and on chloroplast integrity. *Bull. Soc. Bot. France.* 137: 115-123.

Annexes

Annexe 1 : Vecteur de clonage p-GEM Teasy

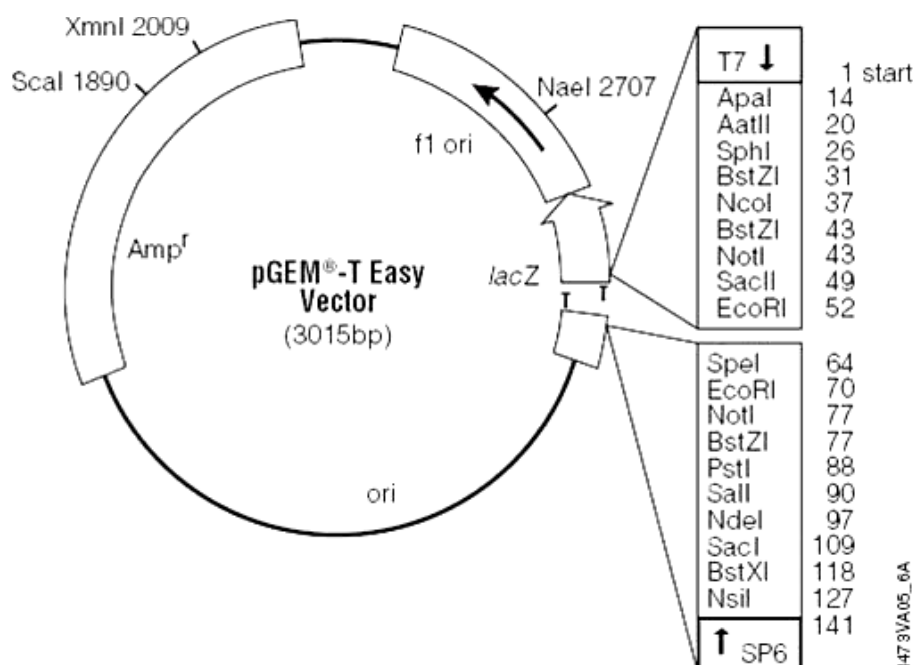


Figure 1 : Carte du vecteur de clonage pGEM®Teasy

Le vecteur de clonage plasmidique pGEM-TEasy (Promega, France), de 3015 pb, comporte un gène de résistance à l'ampicilline (Amp^r), une origine de réplication (ori), une région de clonage avec plusieurs sites de restrictions, des séquences de l'opéron lactose et les séquences des oligos T7 et SP6 (Figure 1). Le vecteur présente une base Thymidine (T) saillante à chacune de ses extrémités 3', tandis que l'amplicon possède une base Adénosine saillante à chaque extrémité 3', (ajoutée par une ADN polymérase). Grâce à la complémentarité des bases, l'amplicon d'intérêt est inséré de façon covalente dans le plasmide par l'action d'une ligase.

L'insertion de l'amplicon est réalisée au niveau du site de polyclonage (entre EcoRI et SpeI) contenant le gène *Lac-Z* codant la β -galactosidase ce qui rend cette dernière inactive. Les colonies bactériennes ayant intégré le vecteur pGEM-Teasy, peuvent se développer sur le milieu LB solide additionné d'antibiotique, grâce à l'expression du gène de résistance à l'ampicilline porté par le plasmide.

Les colonies bactériennes cultivées sur milieu LB additionné de Xgal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) et de l'IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactoside, sont soit bleues, soit

blanches. L'IPTG induit l'expression du gène *Lac-z* porté par le plasmide et codant la β -galactosidase. Cette dernière hydrolyse le composé Xgal, libérant un produit bleu. Ainsi l'insertion de l'amplicon dans le site de polyclonage du plasmide interrompt l'expression du gène *Lac-z*. L'hydrolyse de Xgal n'est alors plus réalisée et des colonies blanches sont observables. Elles contiennent donc potentiellement un plasmide recombinant.

Annexe 2 : Milieux de culture LB

LB liquide (1L)

10 g Bacto Tryptone
5 g Bacto Yeast extract
5 g NaCl
ajuster à pH 7,5 avec NaOH
qsp 1 L avec de l'eau

LB solide (1L)

LB liquide + 15 g/L d'agar
Stériliser par autoclavage

Le brunissement interne de l'ananas (*Ananas comosus*. (L). M) induit par un traitement au froid en post-récolte : physiopathie, mise au point d'outils moléculaires, expression des gènes et activités enzymatiques impliquées dans le catabolisme protéique.

Le traitement au froid en post-récolte (TPR) des ananas (*Ananas comosus*. (L). M) destiné à ralentir la sénescence des fruits, induit « le brunissement interne de l'ananas » (BI). Afin d'étudier des gènes susceptibles de discriminer les variétés résistantes, une comparaison entre des fruits frais ou soumis au TPR a été réalisée pour 4 variétés d'ananas différant par leur résistance au BI. D'après les résultats, en réponse au TPR l'absence de symptômes de BI est associée à une « résistance membranaire » et à une faible activité de la polyphénol oxydase. L'étude de l'activité de la phénylalanine ammonia-lyase et de l'ascorbate peroxidase a révélé que le froid induit une stimulation de l'activité de ces enzymes chez une variété sensible au BI. L'étude du catabolisme protéique a montré que la résistance des fruits au BI était liée : à la sous-expression du gène d'une protéase à cystéine, et à une sur-expression de gènes codant une cystatine et une protéase à acide aspartique, dont l'ADNc a été caractérisé et cloné pour la première fois chez l'ananas. L'expression différentielle de ces gènes indique qu'ils pourraient être utilisés pour le criblage par PCR de variétés dans les programmes d'améliorations de l'ananas pour la résistance au BI.

Mots clés : *Ananas comosus* (L) M, froid post-récolte, expression de gènes, activités enzymatiques, catabolisme protéique.

Induced Blackheart under postharvest chilling stress in Pineapple (*Ananas comosus*. (L). M): physiopathy, design of new tools, expression of genes and enzymatic activities involved in protein catabolism.

Pineapple fruits (*Ananas comosus*. (L). M) require postharvest chilling treatment (PCT) in order to extend the postharvest fruit quality during shipping exportation. However PCT induces an injury known as blackheart (BH), or fruit browning, which is characterized by the appearance of brown spots in the flesh. This work has focused on the study of the development of BH physiopathy in the context of postharvest treatment in 4 pineapple varieties differing in their resistance to BH. Results showed that BH was associated with high membrane resistance, low activity of polyphenol oxidase and absence of the related isoforms. Under chilling stress, the activities of both phenylalanine ammonia-lyase and ascorbate peroxidase were enhanced in the BH susceptible variety. Various genes involved in protein catabolism under abiotic stress were also studied. BH resistance was shown to be linked to the down-regulation of a major cystein protease and to the up-regulation of cystatin, the natural inhibitor of cystein protease. An aspartic acid protease, isolated and sequenced for the first time in pineapple, was also studied. Opposed to cystein protease, the expression and activity of the aspartic acid protease was directly related to BH resistance. Taken together, the results gathered by this work suggest that these genes could provide useful molecular markers for PCR variety screening in breeding programs aimed at improving pineapple BH resistance.

Keywords: Postharvest chilling stress, gene expression, enzymatic activities, proteolysis.